

ISOLIERUNG UND
KONSTITUTIONSAUFKLÄRUNG
DER STEROIDE IN SOLANUM
MARGINATUM L.:
STEROIDFÜHRUNG IN DEN FRÜCHTEN
EINER AUS EQUADOR
STAMMENDEN SORTE

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereiches Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Günter Deckardt
Frankfurt am Main

1977

ISOLIERUNG UND
KONSTITUTIONSAUFKLÄRUNG
DER STEROIDE IN SOLANUM
MARGINATUM L.:
STEROIDFÜHRUNG IN DEN FRÜCHTEN
EINER AUS EQUADOR
STAMMENDEN SORTE

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereiches Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Günter Deckardt
Frankfurt am Main

Referent: Professor Dr. R. Hänsel

Korreferent: Professor Dr. H. Fenner

Tag der mündlichen Prüfung: 25.11.1977

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmakognosie und Phytochemie der Freien Universität Berlin unter Leitung von Herrn Professor Dr. R. Hänsel durchgeführt.

Herrn Professor Dr. R. Hänsel möchte ich herzlich für seine Bemühungen danken, mich mit den wissenschaftlichen Arbeitsmethoden vertraut zu machen, für das Interesse, das er meiner Arbeit entgegengebracht hat und für die zahlreichen Ratschläge, die für mich wertvoll und anregend waren.

Allen Mitarbeitern am Institut möchte ich für die gute Zusammenarbeit danken, vor allem Herrn W. Bähr für seine ständige Hilfsbereitschaft und die Ausführungen der Photoarbeiten.

Meinen besonderen Dank möchte ich Herrn Dr. D. Rosenberg von der Firma Schering A.G. für die Aufnahme und die wertvollen Ratschläge bei der Diskussion der Spektren und Herrn Dr. Ch. von Szczepanski, Schering A.G., der mir das Drogenmaterial zur Verfügung stellte, aussprechen.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	9
2. LITERATURTEIL	12
2.1. Botanische Charakterisierung von Solanum marginatum L.	12
2.2. Bisher isolierte und beschriebene In- haltsstoffe aus Solanum marginatum L.	15
2.3. Weitere Solasodin-Glykoside	20
2.4. Pharmakologische Wirkung von Solasodin	21
2.5. Synthetischer Abbau von Solasodin zu Pregnan	24
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN: HAUPTTEIL	27
3.1. Allgemeine Vorbemerkungen	27
3.2. Aufarbeitung der Solanum marginatum- -Früchte	28
3.3. Vortrennung des Äthanolextraktes: Gewinnung der beiden Hauptfraktionen F-CÄAc und F-Me	30
3.4. Rechromatographie der Fraktionen F-2 bis F-9: Isolierung von SM-1, SM-2 und SM-3	32
3.5. Rechromatographie der Fraktion F-10: Isolierung von SM-4, SM-5 und SM-6	33
3.6. Identifizierung der Substanz SM-1	35
3.6.1. Voruntersuchungen und spektroskopische Untersuchungen	35
3.6.2. Hydrolyse von SM-1	46
3.6.3. Vergleich von SM-1 mit Carpesterol	47
3.7. Identifizierung der Substanz SM-2	51
3.7.1. Voruntersuchungen und spektroskopische Untersuchungen	51
3.7.2. Vergleich von SM-2 mit β -Sitosterol	56

	Seite
3.8. Identifizierung der Substanz SM-3 . . .	58
3.8.1. Voruntersuchungen, Hydrolyse und spektroskopische Untersuchungen . . .	58
3.8.2. Acetylierung von Substanz SM-3 . . .	63
3.8.3. Vergleich von SM-3 mit β -Sitosterol- - β -D-Glukose	65
3.9. Identifizierung der Substanz SM-4 . . .	66
3.9.1. Voruntersuchungen, Hydrolyse und spektroskopische Untersuchungen . . .	66
3.9.2. Die aglykonischen Hydrolyseprodukte der Substanz SM-4	69
3.9.3. Untersuchung des Trisaccharid-Anteils von SM-4	70
3.9.4. Vergleich von SM-4 mit Solamargin . . .	74
3.10. Identifizierung der Substanz SM-5 . . .	75
3.10.1. Voruntersuchungen, Hydrolyse und spektroskopische Untersuchungen . . .	75
3.10.2. Untersuchung des Trisaccharid-Anteils von SM-5	78
3.10.3. Vergleich von SM-5 mit Solasonin . . .	82
3.11. Identifizierung der Substanz SM-6 . . .	83
3.11.1. Voruntersuchungen, Hydrolyse und spektroskopische Untersuchungen . . .	83
3.11.2. Untersuchung des Tetrasaccharid-Anteils von SM-6	85
3.11.3. Zur Konstitution des Tetraosids . . .	91
3.12. Trennung und Isolierung der aglykonischen Hydrolyseprodukte von SM-4, SM-5 und SM-6 .	98
3.13. Identifizierung des Hydrolyseproduktes Rf = 0.38 (= Solasodin)	99
3.13.1. Voruntersuchungen und spektroskopische Untersuchungen	99

	Seite
3.14. Identifizierung des Hydrolyseproduktes Rf = 0.50 (= Solasodien)	109
3.14.1. Voruntersuchungen und spektroskopische Untersuchungen	109
3.14.2. Vergleich des Hydrolyseproduktes Rf = 0.50 mit Solasodien	114
3.15. Röntgenographische Bestimmung der Kon- formation von Solasodin und Solasodien .	116
 4. EIGENE UNTERSUCHUNGEN: EXPERIMENTELLER TEIL	
4.1 Allgemeine Angaben	125
4.1.1. Chromatographie	125
4.1.2. Spektroskopie	127
4.1.3. Schmelzpunktbestimmung	128
4.1.4. Optische Drehung	128
4.1.5. Mikroanalysen	128
4.1.6. Gefriertrocknung	128
4.2. Spezielle Angaben	129
4.2.1. Herkunft der Droge	129
4.2.2. Extraktion der Droge	129
4.2.3. Aufarbeitung der Fraktionen F-1 bis F-9 .	130
4.2.3.1. Aufarbeitung der Mischfraktion F-5 . . .	132
4.2.3.2. Aufarbeitung der vereinigten Fraktionen F-3, F-4 und F-5.2; Kristallisation von SM-1	132
4.2.3.3. Eigenschaften von SM-1	133
4.2.3.4. Aufarbeitung der vereinigten Fraktionen F-5.4 und F-6; Kristallisation von SM-2 .	134
4.2.3.5. Eigenschaften von SM-2	135
4.2.3.6. Aufarbeitung der Fraktion F-8; Kristallisation von SM-3	136

	Seite
4.2.3.7. Hydrolyse von SM-3	137
4.2.3.8. Eigenschaften von SM-3	137
4.2.3.9. Acetylierung der Substanz SM-3	138
4.2.3.10. Eigenschaften von SM-3-acetyliert	138
4.2.4. Aufarbeitung der Fraktion F-10	139
4.2.4.1. Aufarbeitung der Mischfraktion F-10.2	139
4.2.4.2. Aufarbeitung der Mischfraktion F-10.3	142
4.2.4.3. Aufarbeitung der Mischfraktion F-10.4	142
4.2.4.4. Aufarbeitung der vereinigten Fraktionen F-10.2.2 und F-10.3.2; Kristallisation von SM-4	142
4.2.4.5. Eigenschaften von SM-4	142
4.2.4.6. Aufarbeitung der vereinigten Fraktionen F-10.3.3 und F-10.4.2; Kristallisation von SM-5	143
4.2.4.7. Eigenschaften von SM-5	144
4.2.4.8. Aufarbeitung der Fraktion F-10.4.3; Kristallisation von SM-6	145
4.2.4.9. Bestimmung des D-Glukose- und D-Galaktose- -Anteils im Zuckerrest der Substanz SM-6	145
4.2.4.10. Eigenschaften von SM-6	146
4.2.4.11. Hydrolyse der einzelnen Glykoside	147
4.2.5. Isolierung und Kristallisation der aglykonischen Hydrolyseprodukte	148
4.2.5.1. Eigenschaften des Hydrolyseproduktes Rf = 0.38 (= Solasodin)	150
4.2.5.2. Eigenschaften des Hydrolyseproduktes Rf = 0.50 (= Solasodien)	151
5. ZUSAMMENFASSUNG	152
6. LITERATURVERZEICHNIS	155
7. LEBENS LAUF	159

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

In der modernen Arzneimittelforschung und der Therapie verschiedenster Krankheiten nehmen Moleküle mit einem Steroidgrundgerüst eine immer größer werdende Stellung ein. So macht man sich schon seit mehr als zwanzig Jahren Gedanken, wie man dem Bedarf an Steroidhormonen für Pharmaka und somit deren Rohstofffrage gerecht werden kann. Steroidalkaloide, wie sie in verschiedenen Solanum-Arten vorkommen, stellen für dieses Problem eine günstige Lösung dar. Dabei bietet sich besonders das massenhaft wild wachsende Solanum marginatum als potentielle Rohmaterialquelle an, welches nach Kultivierung in großem Maßstab und - bedingt durch die tropische und subtropische Witterung - ständig geerntet werden kann. Die in der Pflanze in überdurchschnittlichen Mengen vorkommenden Steroidalkaloidglykoside führen als Aglykon das Solasodin, welches leicht partialsynthetisch in die jeweils gewünschten Pregnan-Derivate umgewandelt werden kann^{1,2)} (siehe auch Seite 24).

Allerdings ist die Verwendung von Solanum marginatum-Früchten als Ausgangsmaterial zur Partialsynthese von Hormonen nicht ohne eigentümliche Problematik. Vom biologischen Standpunkt aus bestehen zwei Hauptschwierigkeiten - in dem, was man als 'chemische Variabilität' innerhalb der Art bezeichnet und in dem Phänomen, was man unter dem Begriff 'ontogenetische Variabilität' subsumieren kann: Für die Steroidalkaloide in Früchten ist es charakteristisch, daß diese während der Fruchtreife rasch abgebaut werden und

daß die Metabolisierung auch nach der Ernte der unreifen Früchte sich fortsetzen kann. Bisher wurden entsprechende Untersuchungen, welche die 'chemische Variabilität' betreffen, besonders an der Art *Solanum dulcamara* durchgeführt³⁾, solche, die die Metabolisierung betreffen, an *Solanum lycopersicum*⁴⁾.

Die vorliegende Arbeit versteht sich als ein Teilbeitrag zu der Frage der 'chemischen Variabilität' von *Solanum marginatum*. Sie setzt sich das Ziel, die Steroidalkaloidführung von in Equador vorkommenden Sorten zu untersuchen, und die Ergebnisse mit denen zu vergleichen, die seinerzeit von L.H. BRIGGS und Mitarbeitern an Sorten neuseeländischer Herkunft erhalten wurden.

Die Arbeit geht aber über eine bloße Analogie zu BRIGGS' klassischen Arbeiten weit hinaus. Sie beschränkt sich abweichend nicht nur auf die Isolierung, Identifizierung und gegebenenfalls Konstitutionsaufklärung der Steroidalkaloide, vielmehr bezieht sie auch alle anderen Steroide in die Untersuchung ein.

Mit einer breiten Variabilität der Steroidführung bei *Solanum marginatum* ist durchaus zu rechnen, da das Verbreitungsgebiet der Art außerordentlich groß ist. Sie wächst in allen Erdteilen (siehe Abbildung 1), insbesondere im tropischen und subtropischen Mittel- und Südamerika,

auf Neu-Seeland, in Südastralien, Italien, Palästina,
dem Nildelta und Abessinien.



Abb. 1: Vorkommen von *Solanum marginatum* L.

2. LITERATURTEIL

2.1. Botanische Charakterisierung von *Solanum marginatum* L.

Die zu der sehr artenreichen Gattung *Solanum* aus der Familie der Solanaceae (Nachtschattengewächse) gehörende *Solanum marginatum* L. stammt ursprünglich aus Palästina und dem Nildelta⁵⁾, wächst heute jedoch vor allem wild in den subtropischen Gebieten Mittel- und Südamerikas und Neu-Seelands⁹⁾. *Solanum marginatum* L. ist ein 1,50 m hoher Halbstrauch⁶⁾, der gelegentlich bis zu 3 m Höhe erreichen kann⁷⁾. Der verholzte untere, verzweigte Sproßteil ist weißfilzig behaart und mit harten, steifen Stacheln besetzt⁸⁾.

Die Blätter - 12 bis 18 cm lang und 8 bis 12 cm breit - sind lederartig, fast herzförmig und buchtig gelappt⁶⁾. Die Blattoberseite ist glänzend-grün gefärbt und von einem breiten, weißen, unregelmäßigen Streifen am Rand umgeben, der jedoch nicht immer klar zu erkennen ist, da junge Blätter zuerst ganz mit einem wolligen Flaumhaar überzogen sind und ältere die Behaarung manchmal verloren haben. Am deutlichsten tritt dieses Charakteristikum, welches auch den Namen 'marginatum' hervorrief, in der intermediären Blattphase auf. Der weiße Flaum verschwindet stufenweise von der Oberfläche, bleibt jedoch am äußeren Teil des Blattes, wodurch der weiße Rand entsteht⁵⁾. Die Blattunterseite ist ebenfalls weißfilzig behaart. Beiderseits längs der Blattnerven ragen gelbe, gerade Stacheln hervor.



Abb. 2: *Solanum marginatum* L.

rechts: halbierter Fruchtkörper

aus *Plantarum rariorum* (1781)⁴¹⁾



Die weißfilzigen Blütenstände bestehen aus drei bis sechs Blüten, wobei der Kelch immer gerade, niemals zurückgebogen ausgebildet ist. Die eliptisch geformten Kelchblätter von 1 cm Länge und 0.5 cm Breite umgeben die weißen, in der Mitte purpurroten Blütenblätter von ca. 3 cm Durchmesser. Die Staubblätter sind gelb gefärbt⁷⁾.

Die im Durchmesser bis zu 5 cm große, kugelförmige Beere erscheint auf der Seite des Fruchstieles etwas plattgedrückt. Im vollen Reifezustand nimmt die Frucht eine gelbe Farbe an. Das harte, glatte Exokarp fühlt sich pergamentartig an. Das Mesokarp ist saftig und von gelbgrüner Farbe. Die zahlreichen, gelben Samen bestehen aus einem sehr widerstandsfähigem Gewebe⁷⁾. Es liegt hier sowohl parietale als auch zentralwinkelständige Placentation bei einem coenokarp-synkarpen Fruchtknoten vor. Schließlich ist noch der unangenehme Geschmack der Früchte zu erwähnen⁸⁾.

2.2. Bisher isolierte und beschriebene Inhaltsstoffe aus Solanum Marginatum L.

Die chemischen Inhaltsstoffe von *Solanum marginatum* untersuchte hauptsächlich die Arbeitsgruppe BRIGGS^{9,10,11}). Diese verwendete auf Neu-Seeland wachsende Pflanzen. Für *Solanum*-Arten ist es charakteristisch, daß sie als Hauptinhaltsstoffe Steroidalkaloide führen, also stickstoffhaltige Verbindungen, die sich in der Konstitution der Ringe E und F unterscheiden. Bei *Solanum marginatum* weisen die heterocyclischen Ringe E und F der Steroidalkaloide eine Spiroaminoketal-Struktur auf.

L.H. BRIGGS stellte bei seinen Untersuchungen fest, daß die Höhe des Alkaloid-Ertrages vom Zeitpunkt der Ernte, also vom jeweiligen Reifezustand der Früchte abhängig ist. Reife, voll ausgefärbte Beeren sind praktisch alkaloidfrei; unreife, aber schon voll entwickelte, grün-gelbe Früchte sind am steroidalkaloidreichsten. Von diesem Zeitpunkt bis zur vollständigen Reife der Früchte nimmt daher der Gehalt an Steroidalkaloiden ständig ab¹²).

Aus *Solanum marginatum* L. wurden bisher zwei Steroidalkaloide isoliert, die in der Pflanze glykosidisch gebunden vorliegen. Beide Glykoside besitzen das gleiche Aglykon, Solasodin¹⁴), unterscheiden sich daher in der Art des Zuckeranteiles. Zuerst isolierte BRIGGS⁹) das Solamargin, das am C-3 des Aglykons ein Trisaccharid glykosidisch gebunden trägt. Hier sind zwei Moleküle L-Rhamnose an ein Molekül D-Glukose geknüpft, welches dann mit der OH-Gruppe an C-3 des

Aglykons verbunden ist. Der Zuckeranteil wird auch als β -Chacotriose bezeichnet¹³⁾. Solamargin stellt daher folgendes Glykosid dar:

(3 β ,22R,25R)-Spirosol-5-en-3yl-O- α -L-Rhamnopyranosido-(1 $\rightarrow$ 2)-O- α -L-Rhamnopyranosido-(1 $\rightarrow$ 4)-O- β -D-Glucopyranosyl.

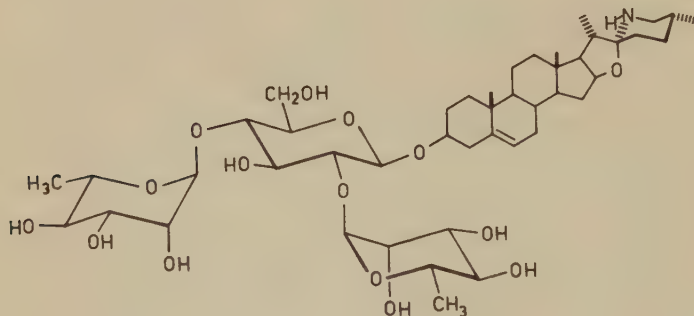


Abb. 3: Solamargin

Als zweites Glykosid aus *Solanum marginatum* isolierte BRIGGS¹⁰⁾ das Solasonin. Hier ist an das Aglykon Solasodin die β -Solatriose geknüpft, bestehend aus jeweils einmolar D-Glukose, D-Galaktose und L-Rhamnose. D-Glukose und L-Rhamnose sind hier über D-Galaktose mit der 3-OH-Gruppe des Solasodin gebunden. Solasonin stellt daher folgendes Glykosid dar:

(3 β ,22R,25R)-Spirosol-5-en-3yl-O- α -L-Rhamnopyranosido-(1 $\rightarrow$ 2)-O- β -D-Glucopyranosido-(1 $\rightarrow$ 3)-O- β -D-Galaktopyranosyl.

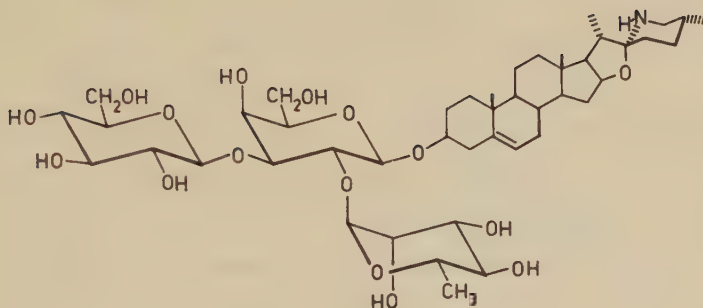


Abb. 4: Solasonin

Ein drittes, in *Solanum marginatum* vorkommendes Glykosid bezeichnete L.H. BRIGGS¹⁵⁾ als Solasodamin. Er nahm an, daß an dem Aglykon Solasodin ein Tetraosid aus zwei Molekülen L-Rhamnose und je einem Molekül D-Glukose und D-Galaktose gebunden ist. Später¹¹⁾ mußte er diese Ansicht nach einer Veröffentlichung von R. KUHN¹⁶⁾ aus dem Jahre 1955 revidieren. Nach röntgenspektroskopischer Analyse und Neubestimmung des Rhamnosegehaltes stellte sich heraus, daß jenes Solasodamin das Monohydrat des Solasonins war.

Die beiden in *Solanum marginatum* vorkommenden Steroidalkaloidglykoside sind gut mit Methanol extrahierbar und lassen sich entweder durch Ausfällen nach Zugabe von NH₄OH¹⁷⁾ oder mit Hilfe einer Kationenaustauschersäule¹⁸⁾ leicht von anderen Pflanzeninhaltsstoffen abtrennen.

Eine Hydrolyse der Glykoside gelingt mit verdünnten Mineralsäuren, nachdem man die Glykoside zuvor in Methanol gelöst hat¹⁹⁾. Das so erhaltene Aglykon Solasodin gehört in die Steroidalkaloidgruppe der 'Spirosolane' in Analogie zu den 'Spirostanen', die an Stelle des Stickstoff-Atoms ein Sauerstoff-Atom besitzen und so zu den Steroidsapogeninen zu zählen sind. Solasodin ist daher in der Konstitution dem Diosgenin gleich, eine Substanz, die als erster Naturstoff partialsynthetisch zu Pregnan-Derivaten umgewandelt wurde. Solasodin ist neben der Doppelbindung Δ^5 durch eine Spiroketalstruktur an C-22 charakterisiert²⁰⁾.

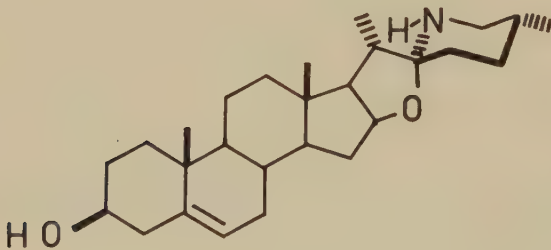


Abb. 5: Solasodin

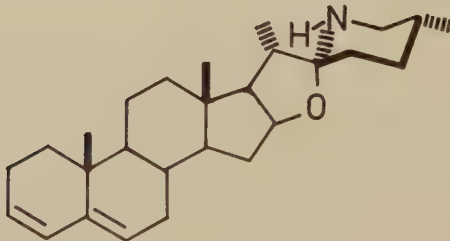


Abb. 6: Solasodien

Während der sauren Hydrolyse der Glykoalkaloide entsteht neben Solasodin stets, zu etwa 25% der Solasodin-Ausbeute, das Solasodien²¹⁾. Hier liegt nach Eliminierung von H_2O eine konjugierte Doppelbindung $\Delta^{3,5}$ vor. Diese Entstehung eines Artefaktes während der Hydrolyse der Solasodin-Glykoside wurde erstmals von A. LABENSKII²²⁾ beschrieben. Sie stellte fest, daß die Bildung von Solasodien von der Temperatur und der HCl-Konzentration abhängig ist, und die gebildete Menge Solasodien sich erhöht, falls Alkohol in der Hydrolyseflüssigkeit enthalten ist.

2.3. Weitere Solasodin-Glykoside

In der letzten Zeit wurden mehrere Glykoside isoliert, die als Aglykon das Solasodin enthalten:

Solasurin isolierten SETH und CHATTERJEE²⁴⁾ aus in Indien wachsenden *Solanum surattense* und *Solanum khasianum*. Es stellt ein Solasodino-L-Rhamnosyl-β-D-Glukosid dar.

Ebenfalls in Indien wächst *Solanum platanifolium*, das von PURI und BHATNAGAR²⁵⁾ untersucht wurde und das Glykosid Solatifolin enthält, dessen Zuckeranteil aus D-Glukose, D-Galaktose und L-Rhamnose besteht; röntgenspektroskopische Untersuchungen jedoch ergaben jedoch keine Übereinstimmung mit schon bekannten Glykoalkaloiden.

BITE und JOKAY²³⁾ wiesen das Vorkommen von Solaradixin in *Solanum laciniatum* nach, einem Tetrasaccharid aus L-Rhamnose, D-Galaktose und 2 Mol D-Glukose.

Bei Solapersin, das von NOVUZOV²⁶⁾ aus *Solanum persicum* isoliert wurde, besteht der Zuckeranteil aus 1 Mol D-Glukose, 1 Mol D-Galaktose und 1 Mol L-Xylose.

Ein Tetraosid mit Solasodin als Aglykon und den Zuckern Glukose : Rhamnose : Galaktose (2:1:1) enthalten nach C. SEELKOPF²⁸⁾ die in Venezuela geernteten Früchte von *Solanum mammosum*.

Im Jahre 1974 wurde von SINGH²⁷⁾ erstmals ein Glykoalkaloid mit Solasodin als Aglykon beschrieben, das in keiner *Solanum*-Art, sondern in der in Mexiko, West-Indien und Indien wachsenden *Nicotiana plumbaginifolia* vorkommt. Sie enthält Solaplumbin, ein Solasodin-Glykosid mit den jeweils einmolar vorkommenden Zuckern D-Glukose und L-Rhamnose.

2.4. Pharmakologische Wirkung von Solasodin

Die Bedeutung der Pflanze *Solanum marginatum* liegt bisher ausschließlich in ihrem reichen Gehalt an Solasodin-Glykosiden. Nach Hydrolyse kann Solasodin leicht partialsynthetisch in Pregnan-Derivate umgewandelt werden. Solasodin selbst besitzt jedoch ebenfalls - wie wir mehreren Mitteilungen entnehmen konnten - pharmakologische Wirkungseigenschaften. Die Untersuchungsergebnisse lassen auf ein breites Wirkungsspektrum schließen, was wohl der Grund sein dürfte, daß Solasodin in keinem pharmazeutischen Präparat enthalten ist.

TUROVA²⁹⁾ befaßt sich mit der L.D.₁₀₀ von Solasodin bei Mäusen. Der Wert liegt bei 38 mg/kg. Diese Wirkung wird auch von den Bauern Südamerikas ausgenutzt, die das Fruchtfleisch von *Solanum marginatum*-Früchten mit Maismehl vermischen und es zum Abtöten von Schaben und Mäusen verwenden²⁸⁾. So genügen 2 g Fruchtfleisch, um eine Maus zu töten. Daß der Alkaloidgehalt in den Früchten am größten ist, wird durch die Tatsache unterstrichen, daß Insekten Blätter und Stengel, aber nie die Beeren auffressen. TUROVA²⁹⁾ beschreibt ferner eine cardiotonische und antiphlogistische Wirkung bei Mäusen, die von einer Diurese begleitet ist. In einer weiteren Arbeit berichtet TUROVA³⁰⁾ von einem therapeutischen Effekt des Solasodin-Citrats bei den verschiedensten Formen des Rheumatismus.

LAHIRI und CHATTERJEE³¹⁾ beschreiben in ihrer Arbeit, die sich mit der gemeinsamen Wirkung der Glykoalkaloide Solamargin und Solasonin befaßt, daß diese Substanzen

Ratten und Mäuse beruhigen und die Pentobarbital-Schlafperiode verlängern. Ferner werden weitere ZNS-hemmende Wirkungen - von beiden Substanzen hervorgerufen - beschrieben: Die Körpertemperatur sinkt, und die Amphetamin-Toxizität wird verringert. Alle Effekte werden mit Dosen von 1-20 mg/kg erreicht.

Die körpertemperatursenkende Wirkung von Solasodin wurde 1976 von KULCSAR-GERGELY³²⁾ genauer untersucht. Er stellte fest, daß die normale Temperatur von Ratten und Mäusen nach einmaliger Dosis von 3 mg/kg um $0,5^{\circ} \pm 0,3^{\circ}$ C für mehr als 24 Stunden bei Ratten und noch stärker bei Mäusen um $2,0^{\circ} \pm 0,2^{\circ}$ C für 48 Stunden gesenkt werde. Auch Fieber, hervorgerufen durch eine Suspension abgetöteter Bakterien oder durch 2,4-Dinitrophenol, wird von Solasodin gesenkt.

Die letale Wirkung von Solasodin erklärt sich durch die Veränderung des Glykogen-Gehaltes in der Leber und einer Zunahme der Leukozyten im peripheren Blut. So wurden dystrophische und nekrobiotische Veränderungen in der Leber, Niere und im Gehirn beobachtet³³⁾.

In der jüngsten Untersuchung wird von KEELER und BROWN³⁴⁾ festgestellt, daß Solasodin in Relation zu Tomatidin und Diosgenin bei Hamstern einen deutlich erhöhten teratogenen Effekt aufweist. So wurden 1184-1628 mg/kg der untersuchten Substanzen am 7. oder 8. Tag der Schwangerschaft appliziert. Bei über einem Drittel der Jungen, die ein Überlebendes, schwangeres, mit Solasodin behandeltes Muttertier gebar,

traten eine oder gleich mehrere Deformationen auf. Bei Solasodin-unbehandelten Tieren traten diese Mißbildungen nur zu einem Zehntel jenes Ergebnisses auf. Als daraufhin die Dosis bei Tomatidin und Diosgenin verdoppelt wurde, konnte dort selbst dann noch keine teratogene Wirkung festgestellt werden.

2.5. Synthetischer Abbau von Solasodin zu Pregnan

Solasodin ist von allen bekannten Solanum-Alkaloiden am besten als Ausgangssubstanz für die industrielle Hormon-partialsynthese geeignet, da es relativ leicht in größeren Mengen zugänglich ist, die für den chemischen Abbau zu Pregnan-Derivaten erforderliche Spiroaminoketal-Struktur der heterocyclischen Ringe E und F besitzt und zusätzlich die für die Partialsynthese der therapeutisch wichtigen Pregnan-Derivate sehr erwünschte Δ^5 -Doppelbindung aufweist³⁵⁾. Die wirtschaftliche Bedeutung von Solasodin wird durch die Tatsache verstärkt, daß der Abbau von tertiären Basen, wie etwa die der Steroidalkaloide mit einem Solanidan-Gerüst, in ein Steroid mit hormoneller Wirkung noch nicht gelingt. So kann z.B. das Solanidin, das Hauptalkaloid der Kartoffel, nicht zu solchen partialsynthetischen Umwandlungen des Moleküls herangezogen werden¹⁴⁾.

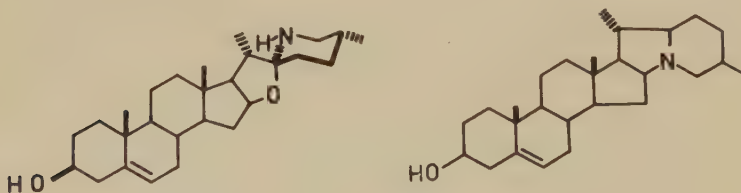


Abb. 7: Solasodin und Solanidin

Solasodin wurde erstmals im Jahre 1951 von SATO^{36,37)} zum Pregnadienolon-Acetat abgebaut. Er verwendete dabei das gleiche Reaktionsschema wie es zuvor bei dem Abbau der Spirostane (Diosgenin) angewandt wurde³⁸⁾.

Inzwischen wurden von verschiedenen Forschern unterschiedliche Abbaureaktionen von Solasodin zu Pregnan-Derivaten beschrieben. Das aktuellste und auch von den Ausbeuten her befriedigendste Abbauschema³⁹⁾ (siehe Abbildung 8) von Solasodin(I) beruht im ersten Schritt auf einer milden, kontrollierten Acetylierung mit Hilfe von

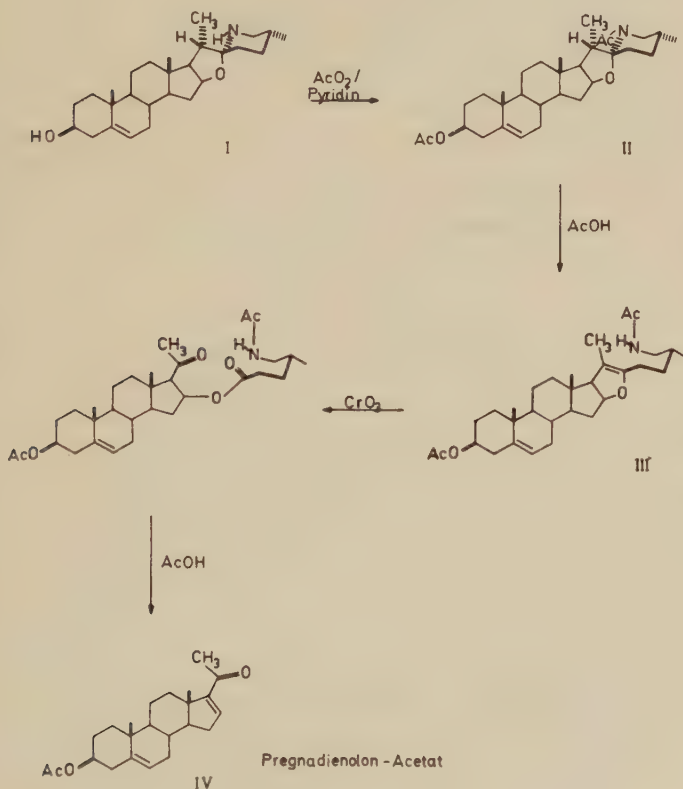


Abb. 8: Abbaureaktion von Solasodin

3,8 Moläquivalenten Essigsäureanhydrid in Pyridin (1 Stunde unter Rückfluß), der eine prototrope Pseudomerisation des entstandenen Diazetats(II) folgt, wobei 15 Minuten lang mit Eisessig gekocht wird. Daran schließt sich eine in der Kälte (unter 15° C) durchgeführte Oxidation des erhaltenen 26-Acetyl-Aminofurosta-5,20-dien-Derivates(III) mit 2 Moläquivalenten Chromtrioxid in 80%iger Essigsäure an. Schließlich wird die 16- β -Seitenkette mit kochendem Eisessig abgespalten. Man erhält mit diesem Reaktionsschema eine Ausbeute von 65% 3- β -Acetoxy-Pregna-5,16-dien-20-on(IV).

E I G E N E U N T E R S U C H U N G E N

3. HAUPTTEIL

3.1. Allgemeine Vorbemerkungen

Ziel der vorliegenden Untersuchung ist - wie schon in der Einleitung beschrieben - die unreifen Früchte von aus Equador stammenden *Solanum marginatum*-Pflanzen auf ihre Steroidführung hin zu untersuchen. Im Gegensatz zu anderen Stoffgruppen wie Alkaloiden, Säuren oder Phenolen gibt es für Pflanzensteroiden keinen selektiven Isolierungsgang. Pflanzensteroiden sind im allgemeinen Neutralstoffe und können hinsichtlich ihrer Polarität einerseits extrem lipophil aber auch - und zwar als Glykoside - gut in Wasser löslich sein. Daneben kommen basische Vertreter als glykosidische Steroidalkaloide vor. Wenn es Ziel der Arbeit war, möglichst alle Steroiden zu isolieren, so mußte ein möglichst systematisches Fraktionierungsverfahren gewählt werden: ein Fraktionierungsverfahren, das nach Polarität die pflanzlichen Extraktivstoffe aufzuteilen erlaubt.

Natürlich bedarf es eines Leitfadens bei der Fraktionierung. Im vorliegenden Falle wird die dünnschichtchromatographische Prüfung in Verbindung mit der Chlorsulfonsäure-Reaktion gewählt. Man muß sich dabei im Klaren sein, daß an Hand dieses Leitfadens nicht nur die typischen Steroiden verfolgt werden, sondern auch die Triterpene, ein Nachteil sicher,

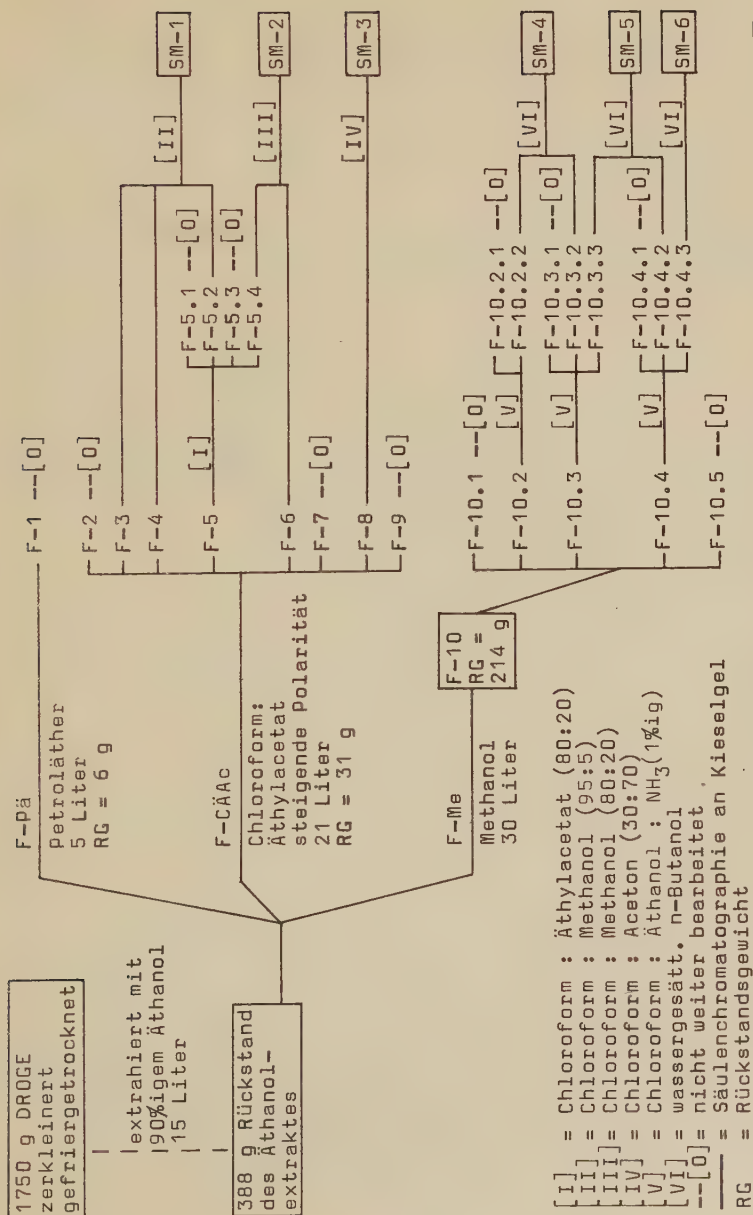
der aber in Kauf genommen wird. Für die Verfolgung der basischen Alkaloide wird in Ergänzung zu dem Steroidreagens das Dragendorff-Reagens herangezogen.

3.2. Aufarbeitung der Solanum marginatum-Früchte

Unreife Früchte lassen sich als ein biologisches System ansehen, in dem besonders lebhafte Stoffwechselumsetzungen im Gange sind. Die Aufarbeitung muß daher so erfolgen, daß diese Metabolisierung zu einem möglichst einheitlichen Zeitpunkt abrupt unterbrochen wird. Die Früchte wurden in einem bestimmten Vegetationsstadium in Equador geerntet: Sie mußten bereits die für die Frucht typische maximale Größe erreicht haben, durften aber noch keine Anzeichen einer Gelbfärbung aufweisen. Der Schiffstransport dauerte im Durchschnitt bei normaler Temperatur etwa vier Wochen.

Die so importierten Früchte werden - um Abbauvorgänge beim Zerkleinern möglichst zu verhindern - zerschlagen und nach dem Gefriertrocknungsverfahren aufgearbeitet. Dies hat den Vorteil, daß bei der sich anschließenden Extraktion die Zellinhaltsstoffe rasch und auch quantitativ herausgelöst werden und deren eventueller Zersetzung durch Hydrolyse vorgebeugt wird⁴⁰⁾ (ermittelter Wassergehalt der Früchte: 66 %).

Die Extraktion der gefriergetrockneten Masse mit 96%igem Äthanol liefert die Summe der in der Droge überhaupt extrahierbaren Bestandteile (22 %). Die Trennung der Extraktivstoffe nach Polarität erfolgt säulenchromatographisch an Kieselgel. Wie das Fraktionierungsschema (siehe Tabelle 1)



Tab. 1: Fraktionierungsschema zur Isolierung der Substanzen SM-1 bis SM-6.

zeigt, werden insgesamt sechs Substanzen dünnschichtchromatographisch geortet und über zum Teil mehrfache Rechromatographie unter variierenden Bedingungen so angereichert, daß sie zur Kristallisation gebracht werden können.

3.3. Vortrennung des Äthanolextraktes: Gewinnung der beiden Hauptfraktionen F-CÄAc und F-Me

Nach Entfernen des Extraktionsmittels Äthanol wird der dabei resultierende Rückstand mit Celite verrieben (1+1), so daß ein streufähiges Pulver entsteht, das zur Grobtrennung auf mit Kieselgel beschickte Säulen gebracht wird. Nun wird mit verschiedenen Lösungsmitteln bzw. Lösungsmittelgemischen steigender Polarität eluiert. Die dabei erhaltenen Fraktionen werden dünnschichtchromatographisch auf Kieselgel-Fertigplatten 'Merck' mit dem Fließmittelgemisch Toluol : Aceton (80:20) untersucht. Zur Sichtbarmachung der in der Droge enthaltenen Steroide wird die entwickelte DC-Platte mit dem Chlorsulfonsäure-Reagens (Reagens-Nr. 49⁴⁵) besprüht und etwa 5 Minuten lang bei 120° C erhitzt.

In der nach erschöpfender Eluierung mit Petroläther anfallenden Fraktion F-1 zeigt sich noch kein Pflanzeninhaltsstoff, der positiv auf das Chlorsulfonsäure-Reagens reagiert.

Nach DC-Überprüfung der durch unterschiedliche Mischungsverhältnisse steigender Polarität der Lösungsmittel Chloroform und Äthylacetat gewonnenen Fraktionen F-2 bis F-9

können insgesamt drei Steroide nachgewiesen werden, die im Folgenden als SM-1, SM-2 und SM-3 bezeichnet werden (siehe Tabelle 2).

	Rf-Wert	Tgl.	Farbreaktion	
			254 nm	366 nm
SM-1	0.76	gelb	hellblau	leuchtend gelb
SM-2	0.55	braun	dunkelgrau	braun
SM-3	0.13	braun	dunkelgrau	braun
Fließmittel: Toluol : Aceton (80:20)				
Detektion: Chlorsulfonsäure-Reagens				

Tab. 2: DC der mit Chloroform-Äthylacetat (steigende Polarität) eluierbaren und gegenüber dem Chlorsulfonsäure-Reag. positiv reagierenden Substanzen.

Die durch Elution mit Methanol gewonnene Fraktion F-10 enthält drei auf das Chlorsulfonsäure-Reagens positiv reagierende Substanzen, die im Folgenden als SM-4, SM-5 und SM-6 bezeichnet werden. Diese drei Substanzen reagieren auch gegenüber dem Dragendorff-Reagens (Reagens-Nr. 89⁴⁵) positiv:

	Rf-Wert	Farbreaktion (Tageslicht)	
		Chlorsulfonsäure-R.	Dragendorff-R.
SM-4	0.44	braun	orange
SM-5	0.31	braun	orange
SM-6	0.15	braun	orange
Fließmittel: CHCl_3 : $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$: NH_3 (1%ig) (20:20:10)			

Tab. 3: DC der mit Methanol eluierbaren und sowohl dem Chlorsulfonsäure- als auch dem Dragendorff-Reag. gegenüber positiv reagierenden Substanzen.

3.4. Rechromatographie der Fraktionen F-2 bis F-9:

Isolierung von SM-1, SM-2 und SM-3

Wie im Fraktionierungsschema (siehe Tabelle 1) angedeutet, werden die mit Chloroform : Äthylacetat steigender Polarität erhaltenen Eluate in insgesamt 8 Fraktionen F-2 bis F-9 unterteilt. Nach dünnschichtchromatographischer Prüfung ist eine chlorsulfonsäure-positive Substanz vom hRf 76 in den Fraktionen F-3 und F-4 enthalten. Es folgt eine Mischfraktion F-5, die neben der rasch wandernden Substanz SM-1 eine langsamer wandernde Substanz SM-2 enthält. Fraktion F-6 führt außer SM-2 keine chlorsulfonsäure-positiven Inhaltsstoffe. Die Mischfraktion F-5 wird durch Säulenchromatographie so fraktioniert, daß SM-1 von SM-2 getrennt im Eluat erscheinen und diese dann jeweils mit den entsprechenden Hauptfraktionen vereinigt werden. Für die letzte Feintrennung (säulenchromatographische Rechromatographie) stehen demnach insgesamt 3 Fraktionen zur Verfügung:

Neue Fraktionen	entstanden durch Vereinigung der Fraktionen
F _{SM-1}	F-3, F-4 und F-5.2
F _{SM-2}	F-5.4 und F-6
F _{SM-3}	F-8

Jede dieser Fraktionen wird, wie die nachfolgende Tabelle 4 zeigt, erneut rechromatographiert. Die jeweils gegenüber Chlorsulfonsäure positiv reagierenden Fraktionen ergeben nach Verjagen des Lösungsmittels Rückstände, die aus wenig Methanol bzw. Aceton kristallisieren.

	Säulenchromat. Fließmittel	Umkrist. in	Kristallisiert Menge in mg	Ausbeute (bez. trock. Droge)
F _{SM-1}	CHCl ₃ :CH ₃ OH (80:20)	Methanol	1243 mg SM-1	0.023 %
F _{SM-2}	CHCl ₃ :CH ₃ OH (80:20)	Methanol	1418 mg SM-2	0.027 %
F _{SM-3}	CHCl ₃ :Aceton (30:70)	Aceton	389 mg SM-3	0.007 %

Tab. 4: Isolierte Steroide aus F-2 bis F-9.

3.5. Rechromatographie der Fraktion F-10: Isolierung von SM-4, SM-5 und SM-6

Der nach erschöpfter Elution mit Methanol entstandene Rückstand F-10 wird wie im Fraktionierungsschema (siehe Tabelle 1) angedeutet, säulenchromatographisch in der Weise aufgetrennt, daß insgesamt 5 Fraktionen F-10.1 bis F-10.5 resultieren. Drei dieser Fraktionen (F-10.2, F-10.3 und F-10.4) werden rechromatographiert. Dabei wird die Mischfraktion F-10.3 so aufgearbeitet, daß SM-4 und SM-5 getrennt im Eluat erscheinen, analog Mischfraktion F-10.4 so, daß SM-5 und SM-6 getrennt im Eluat vorliegen. Anschließend werden diejenigen Teilfraktionen zusammengefügt, die die gleiche dünnenschichtchromatographisch nachgewiesene Substanz enthalten, wodurch für die letzte Feintrennung (Säulenchromatographie) insgesamt drei Fraktionen gebildet werden:

Neue Fraktionen	entstanden durch Vereinigung der Fraktionen
F _{SM-4}	F-10.2.2 und F-10.3.2
F _{SM-5}	F-10.3.3 und F-10.4.2
F _{SM-6}	F-10.4.3

Die jeweils sowohl dem Chlorsulfonsäure- als auch dem Dragendorff-Reagens gegenüber positiv reagierenden Fraktionen werden i.V. eingeengt und die Rückstände aus wenig Äthanol bzw. Methanol kristallisiert:

	Säulenchromat. Fließmittel	Umkrist. in	Kristallisierte Menge in g	Ausbeute (bez. trock. Droge)
F _{SM-4}	wasser- gesättigtes	Äthanol (75%ig)	12.4 g SM-4	0.23 %
F _{SM-5}		Äthanol (96%ig)	16.2 g SM-5	0.30 %
F _{SM-6}	n-Butanol	Methanol	7.6 g SM-6	0.14 %

Tab. 5: Isolierte Steroide aus F-10.

3.6. Identifizierung der Substanz SM-1

3.6.1. Voruntersuchungen und spektroskopische Untersuchungen

Substanz SM-1 kristallisiert aus Methanol als fettig-glänzende Plättchen mit einem Schmelzpunkt von 252° C.

Sie ist optisch aktiv:

$$[\alpha]_D^{25} = +71^\circ \text{ (Pyridin, } c = 1.13)$$

Die Summenformel stimmt auf

C₃₇H₅₄O₄ (562.84) Ber.: C 78.96 % H 9.67 %

Gef.: C 78.67 % H 9.68 %

Die Reaktion nach LIEBERMANN-BURCHARD (Probe auf Steroide und Triterpene) verläuft positiv.

Im IR-Spektrum (Abb. 9) treten starke Banden bei 2970 cm⁻¹ (CH-Valenzschwingungen) auf, die auf mehrere Methyl- und Methylengruppen hinweisen, wie sie z.B. in Steroiden vorhanden

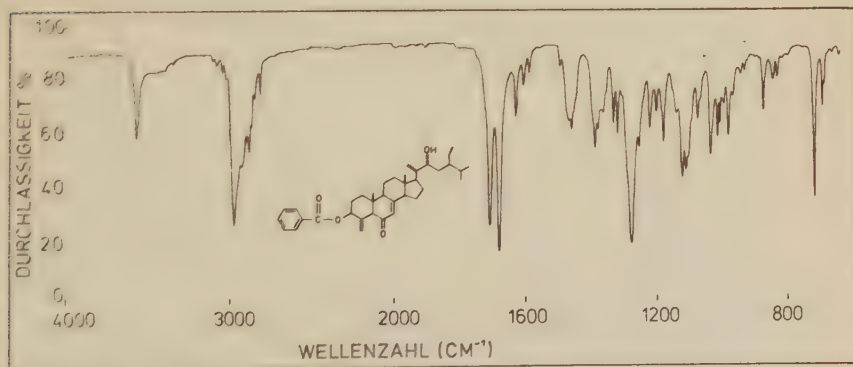


Abb. 9: IR-Spektrum von Substanz SM-1

sind. Als besonders charakteristisch fallen im IR-Spektrum auf:

- (1) die scharfe Bande bei 3570 cm^{-1} , die auf eine freie OH-Gruppe hindeutet (OH-Valenzschwingung).
- (2) zwei scharfe Banden im Bereich der C=O-Valenzschwingung, wobei die eine bei 1680 cm^{-1} für ein α,β -ungesättigtes Keton charakteristisch ist, was auch durch die Bande bei 980 cm^{-1} bestätigt wird, die eine C-H-Deformationsschwingung einer $>\text{C}=\text{C}<$ -Bindung darstellt. Sodann eine Bande bei 1708 cm^{-1} , die für das Vorliegen einer weiteren funktionellen Gruppe mit Carbonyl-Struktur spricht.

Das in CDCl_3 aufgenommene NMR-Spektrum (Abb. 10) zeigt im Bereich 2.4 - 0.5 (δ) die für ein Steroidgerüst typischen sich

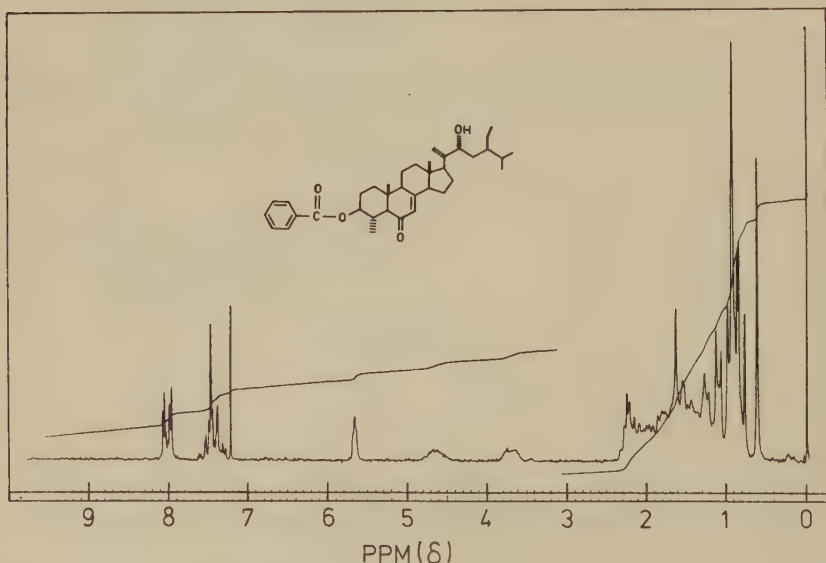


Abb. 10: ^1H -NMR-Spektrum von SM-1 (in CDCl_3)

Überlagernden Resonanzen von Methylengruppen und zwei aus diesem Bereich herausragende Singulettts, die offensichtlich den beiden angulären Methylgruppen C-19 (0.93 ppm) und C-18 (0.64 ppm) zuzuordnen sind. Die genaue Lage dieser Methylgruppen hängt nach ZÜRCHER^{46,47)} und SCHERRER⁴⁸⁾ von anderen funktionellen Gruppen im Molekül und deren Stereochemie ab: Daher interessiert im vorliegenden Fall der Einfluß einer Enongruppe:

Chemische Verschiebung in CDCl_3 [ppm(δ)]:		
C-19-Protonen	C-18-Protonen	ENON-System
1.043	0.917	3-Keto- Δ^1
1.207	0.850	3-Keto- Δ^4
0.895	0.615	6-Keto- Δ^7
1.253	0.870	7-Keto- Δ^5
1.172	0.912	12-Keto- Δ^9

Tab. 6: Chemische Verschiebung der C-19- und C-18-Protonen unter Einfluß einer Enongruppe

Substanz SM-1 sollte daher eine 6-Keto- Δ^7 -Gruppierung im Molekül enthalten.

Zunächst Überraschend für ein pflanzliches Steroid sind die Signale im Aromatenbereich und zwar Multipllett-Peaks im Bereich 8.2 - 7.3 ppm(δ) für 5 aromatische Protonen. Diese erscheinen als Di-ortho/di-meta-System ($J = 8$ Hz und $J = 3$ Hz). Die chemische Verschiebung nach tieferem Feld gegenüber einem unsubstituierten Benzol beweist, daß ein elektronenziehender Substituent den ansonsten unsubstituierten Benzolring (5 Protonen) mit dem Steroid verbindet⁴⁹⁾. Es liegt

nahe, dieses Ergebnis mit der im IR-Spektrum beobachteten Bande bei 1708 cm^{-1} , die eine C=O-Gruppierung hervorrief, zu kombinieren und das Vorliegen eines Benzoesäureesters zu postulieren.

Sowohl die 6-Keto- Δ^7 -Gruppierung als auch der Benzoesäureester stellen chromophore Systeme dar: ein s-trans-Enon-System und ein Benzoyl-Chromophor. Diese beiden können nun entweder isoliert oder konjugiert im Molekül stehen. Das UV-Spektrum (Abb. 11) der Substanz SM-1 zeigt ein einziges Maximum bei $\lambda_{\text{max}} = 233\text{ nm}$ und $\epsilon = 19.700$ (Lösungsmittel: Methanol Uvasol 'Merck').

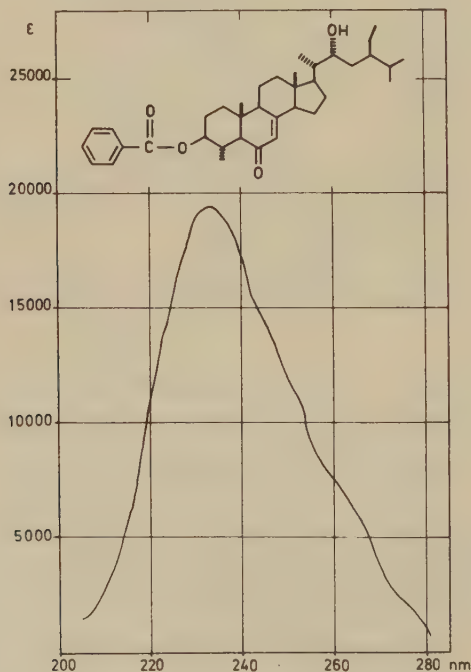


Abb. 11: UV-Spektrum von SM-1

Da beide Chromophore offensichtlich (siehe Tabelle 7) additiv sind, kommt nur eine isolierte Stellung der beiden Chromophore in Frage.

System	$\lambda_{\max}$	ϵ -Wert
ENON(6-Keto- Δ^7)	244	12500 (berechnet nach SCOTT ⁵⁰))
α -Ecdyson ⁵¹⁾	242	12400
Benzoat	228	10000
$\sum$ Enon Benzoat Erwartungsbereich	230-240	20000
gemessener Wert	233	19700

Tab. 7: λ - und ϵ -Werte verschiedener Chromophore

Methylgruppen in einem Steroid treten im ^1H -NMR-Spektrum (Abb. 10) bei sehr hohem Feld im Bereich 1.5 - 0.5 ppm(δ) auf. Bei der Interpretation dieses Bereiches ziehen wir wegen der besseren Auflösung dieses Bereiches ein in Pyridin- d_5 aufgenommenes Spektrum von SM-1 heran (Abb. 12). Dabei fällt auf, daß ein in CDCl_3 nicht beobachtbares Dublett nun bei 1.24 ppm(δ) erscheint. Dieses muß von einer Methylgruppe stammen und außerdem erst durch den Einfluß von Pyridin- d_5 erkennbar werden. Für diesen Effekt gibt es eine Erklärung: Pyridin- d_5 hat die Eigenschaft, sich an eine Keto-Gruppe anzulagern und so eine Verschiebung der nahegelegenen Protonen bzw. Gruppierungen zu verursachen. Es muß sich daher in der Nachbarschaft der 6-Keto-Gruppe eine Methylgruppe befinden. Diese kann sich nicht am C-5 befinden, da diese Methylgruppe als Singulett erscheinen

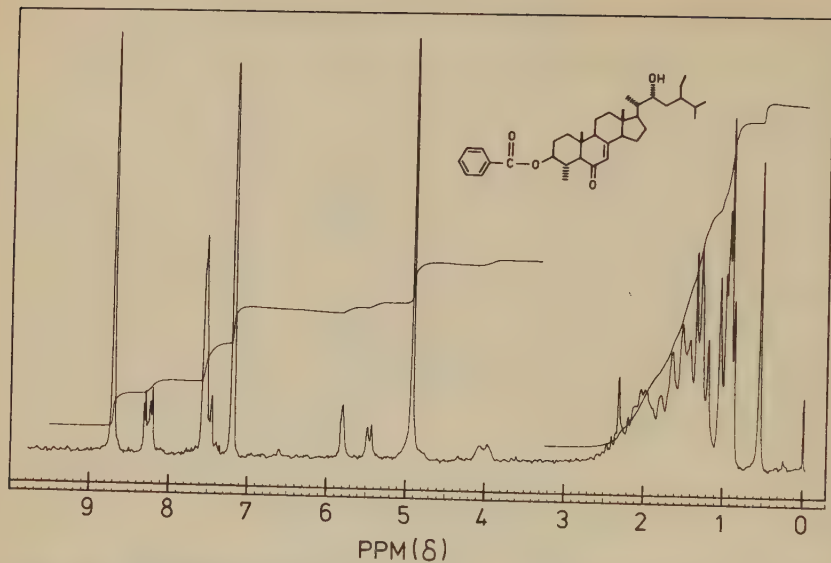


Abb. 12: ^1H -NMR-Spektrum von Substanz SM-1 (in Pyridin-d_5).

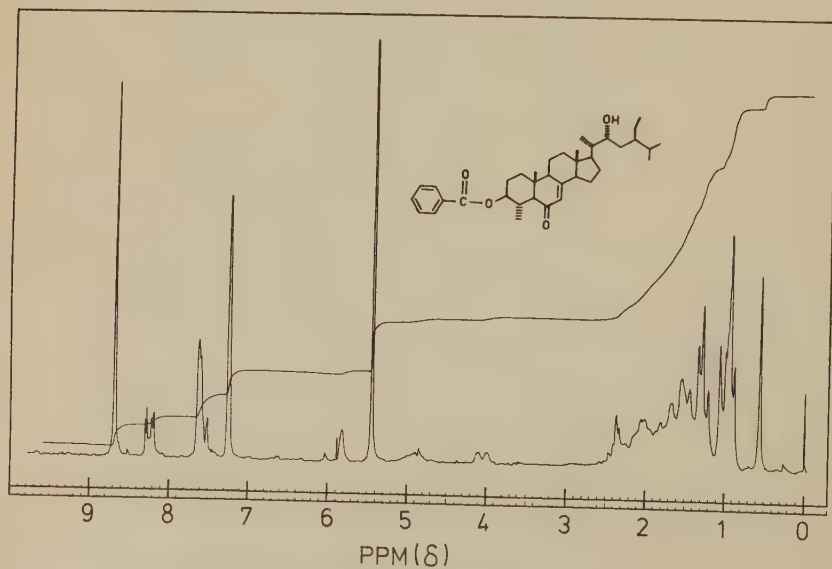
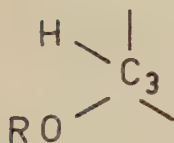


Abb. 13: ^1H -NMR-Spektrum von Substanz SM-1 (in Pyridin-d_5) nach H/D -Austausch.

würde. Auch eine Methylgruppe an C-2, C-3 oder C-14 ist nicht möglich, da der Einfluß von Pyridin nicht über eine solch große Entfernung im Molekül reichen würde. Wir können daher für die Substanz SM-1 eine Methylgruppe an C-4 postulieren.

Nun fragt es sich, wo der Benzoylsubstituent mit dem Steroidgerüst verknüpft ist. Die pflanzlichen Steroide haben im Allgemeinen am C-3 eine β -ständige OH-Gruppe, wobei das geminale Proton bei 3.0 - 4.5 ppm(δ) erscheint. Wir finden nun dieses Multipllett bei 4.68 ppm(δ). Da dieses sehr breit ausgebildet ist, stammt es von einem axial-stehenden Proton. Die paramagnetische Verschiebung läßt sich dadurch interpretieren, daß die freie OH-Gruppe mit einer Säure verestert ist, welche das Proton an C-3 stärker entschirmt:



zu erwartendes Signal des C-3-H

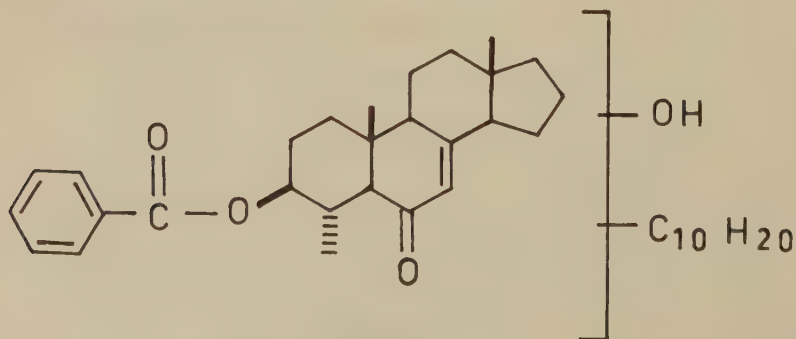
R = H	3.0 - 4.5 ppm(δ)
R = Ac	4.40 - 4.90 ppm(δ)
R = Bz	4.93 - 4.98 ppm(δ)

An und für sich liegt unser Wert im Erwartungsbereich für ein Acetat, jedoch kann das Vorliegen eines Acetates ausgeschlossen werden, da die Signale für $-\text{COCH}_3$ in dem für Acetate charakteristischen Bereich (Singulets bei etwa 2.0 ppm(δ)) fehlen. Aber auch ein Benzoessäureester an C-3 scheint nicht vorzuliegen, da unsere Werte für das geminale C-3-Proton nicht mit den zu erwartenden übereinstimmen. Nach einer Arbeit von DANNEELS⁴²⁾ muß man jedoch

in manchen Fällen einen Korrekturfaktor bei der Deutung der Lage des C-3-Protons beachten: Befindet sich in einem Cyclohexanring dieses Proton in axialer Lage und steht vicinal dazu eine Methylgruppe in Äquatoriallage, so bewirkt diese Methylgruppe eine Abschirmung um -0.31 ppm. Da, wie bereits oben dargelegt, andere Überlegungen dazu geführt hatten, eine Methylgruppe in Stellung C-4 zu verlegen, so wird nunmehr - in Ergänzung dazu - eine äquatoriale Stellung dieser Methylgruppe allen beobachtbaren Signalen in diesem Bereich (Auftreten eines Multipletts bei 4.68 ppm(δ) statt etwa 4.95 ppm(δ)) gerecht: Es liegt an C-3 des Steroids eine β -ständige Benzoeestergruppierung vor, der eine α -ständige Methylgruppe (am C-4) benachbart ist.

Im NMR-Spektrum fällt sodann ein sehr breites Multiplett bei 3.74 ppm(δ) auf. Dies ist der Bereich, in dem das geminale Proton einer freien OH-Gruppe erscheint, so daß sich im Molekül der Substanz SM-1 eine freie OH-Gruppe befindet, über deren Lage erst die Massenspektren eine Aussage erlauben.

Aus den bisherigen Daten kann daher eine vorläufige Teilstruktur des Moleküls zusammengestellt werden:



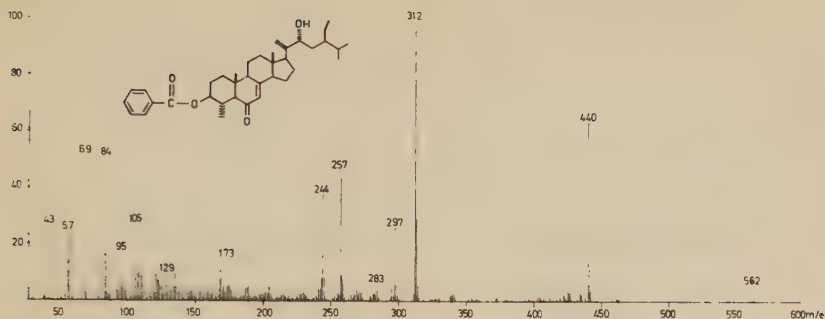


Abb. 14: Massenspektrum von SM-1

Im Massenspektrum von SM-1 (Abb. 14) können wir einen Molpeak bei m/e 562 beobachten. Charakteristisch für mit Benzoesäure veresterte Steroide ist nach VON UNRUH und SPITELLER^{53,54,55}) das Auftreten des Signals M-122, in unserem Fall m/e 440. Dieses entsteht durch Austritt unsubstituierter Benzoesäure $C_7H_6O_2$.

Bisher ungeklärt bei der Konstitutionsbestimmung von Substanz SM-1 ist das Aussehen der C-17-Seitenkette. Wie in der bisherigen Teilstruktur des Moleküls gezeigt, sind der Substanz SM-1 noch zwei Molekülbestandteile zuzuordnen:

- (1) das im NMR-Spektrum beobachtete Signal einer freien OH-Gruppe
- (2) eine dem Ergebnis der Elementaranalyse gerecht werdende restliche $C_{10}H_{20}$ -Gruppe.

Andererseits ergibt sich aus dem vorläufigen Steroidgrundgerüst nach Abspaltung der Benzoesäure ein $C_{20}H_{27}O$ -Körper, der im Massenspektrum das Signal m/e 283 ergibt. Daraus folgt, daß die freie OH-Gruppe sich nicht in dem Steroidgrundkörper sondern in der C-17-Seitenkette

befindet, und diese ebenfalls aus dem $C_{10}H_{20}$ -Fragment besteht, so daß die C-17-Seitenkette die Bruttoformel $C_{10}H_{21}O$ aufweist. Im Massenspektrum erscheint die gesamte Seitenkette als Ion m/e 157. Aus diesem Fragment tritt H_2O aus, wodurch das Ion m/e 139 entsteht ($157 - 28 = 139$); eine Bestätigung, daß sich die freie OH-Gruppe in der C-17-Seitenkette befindet.

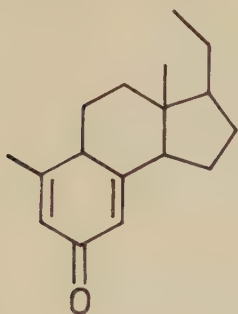
Es stellt sich nun die Frage, mit welchem C-Atom diese OH-Gruppe verbunden ist. Dies können wir mit Hilfe mehrerer deutlicher Signale des Massenspektrums postulieren:

- (1) An C-24 der C-17-Seitenkette befindet sich eine Äthylgruppe. Dies ergibt sich aus dem Ion m/e 84 (C_6H_{12} -Abspaltung)⁵⁴⁾ und dem durch nachfolgende Methyl-Abspaltung entstehenden Ion m/e 69. Daraus ergibt sich, daß sich die freie OH-Gruppe entweder an C-22 oder C-23 sich befindet.
- (2) Der Basispeak im Massenspektrum von SM-1 befindet sich bei m/e 312. Dieses Fragment entsteht aus dem Steroidgrundkörper nach Abspaltung der Benzoesäure sowie dem aus C-20 und C-21 bestehenden Teil der C-17-Seitenkette nach Aufspaltung der Bindung C-20/C-22.

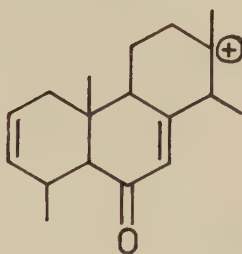
Aus dem Auftreten des letzten Spaltproduktes folgt, daß die OH-Gruppe am C-22 sitzt. Der restliche Teil der Seitenkette ergibt das Signal m/e 129.

Auch die beiden auffallenden Fragmente m/e 244 und m/e 257 sind ein Beweis für die Lage der OH-Gruppe an

C-22. Diese entstehen erst nach Aufspaltung der C-20/C-22-Bindung:



m/e 244



m/e 257

Ein massenspektroskopisches Fragmentierungsschema der Substanz SM-1 gibt Abbildung 15 wider.

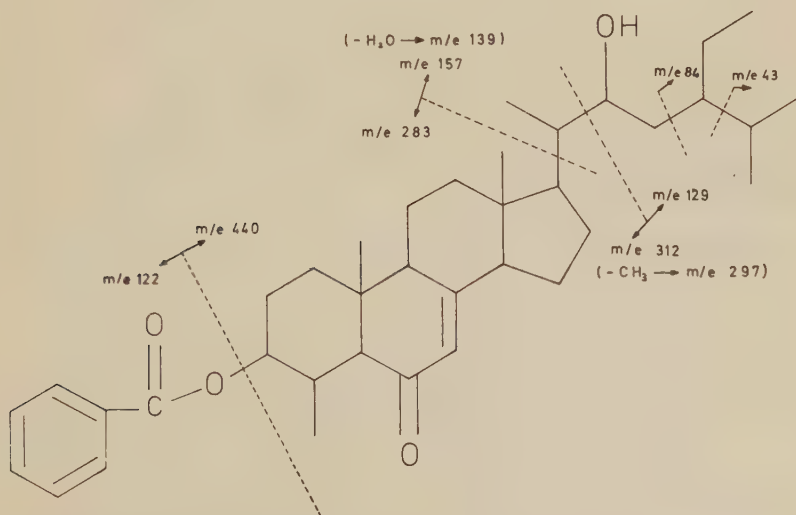


Abb. 15: Massenspektroskopisches Fragmentierungsschema von SM-1.

3.6.2. Hydrolyse von SM-1

Wie dargelegt, handelt es sich bei SM-1 um ein Estersteroid. Es liegt nahe, diesen Ester alkalisch oder sauer zu verseifen und die Verseifungsprodukte getrennt zu analysieren. Tatsächlich gelingt es leicht, sowohl nach saurer (5%ige äthanolische HCl) als auch nach basischer (5%ige äthanolische KOH) Hydrolyse Benzoesäure aus dem Reaktionsgemisch zu isolieren. Die Identitätsprüfung erfolgt in der üblichen Weise durch Schmelzpunkt, Mischschmelzpunkt und DC-Vergleich mit einer authentischen Probe Benzoesäure:

Schmelzpunkt Benzoesäure*	: 121° - 122° C
Schmelzpunkt Hydrolyseprodukt SM-1	: 120° - 121° C
Mischschmelzpunkt beider Substanzen:	119° - 121° C
	Rf-Wert
Benzoesäure*	0.52
Hydrolyseprodukt SM-1	0.52
Fließmittel: CH ₃ OH : H ₂ O (1:1)	
* Handelsprodukt der Fa. Merck	

Tab. 8: Schmelzpunkt- und DC-Vergleich von Benzoesäure und dem Hydrolyseprodukt von SM-1

Das Steroidaglykon auf ähnliche Weise zu fassen, gelingt nicht, da der Steroidteil unter den angegebenen Bedingungen nicht beständig ist und mehrere (nach DC-Prüfung mindestens 5) Spaltprodukte erkennen läßt. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit Angaben der Literatur. Beispielsweise konnte SCHERRER⁴⁸⁾ zeigen, daß in 6-Keto- Δ^7 -Systemen Isomerisierung

gen (Verschiebungen der Doppelbindung) erfolgen können. Insbesondere wurde eine Verschiebung aus der konjugierten 6-Keto- Δ^7 -Stellung in die nicht mehr konjugierte 6-Keto- $\Delta^{8(14)}$ -Stellung beobachtet⁵⁶⁾. Dies überrascht zunächst, ist aber mit der ungewöhnlich großen Ringspannung von 6-Keto- Δ^7 -Steroiden erklärlich, die durch Isomerisierung beträchtlich abnimmt.

3.6.3. Vergleich von SM-1 mit (22R)-22- α -Hydroxy-6-oxo-4- α - -Methyl-5 α -Stigmast-7-en-3 β -yl-Benzoat (Carpesterol)

Eine Durchsicht der Literatur ergibt, daß eine Substanz mit den physikalischen Daten, wie sie für Substanz SM-1 gefunden wurden, bereits einmal beschrieben ist: Die nachstehende Tabelle 9 zeigt vergleichend die in der Literatur angegebenen und die von uns für SM-1 gefundenen Daten. Danach kann es sich bei der Substanz SM-1 um das von J.A. BEISLER und Y. SATO^{57,58,59)} beschriebene *C a r p e s t e r o l* handeln, das diese aus in Indien wachsenden *Solanum xanthocarpum*-Pflanzen isolierten. Wir haben daraufhin Herrn Prof. BEISLER um die Überlassung einer authentischen Probe von (22R)-22- α -Hydroxy-6-oxo-4- α -Methyl-5 α -Stigmast-7-en-3 β -yl-Benzoat gebeten*.
Der Schmelzpunkt einer Verreibung beider Substanzen zeigt keine Depression (siehe Tabelle 9). Im IR-Überlagerungsspektrum sind die Kurven beider Substanzen deckungs-

* Wir danken Herrn Prof. J.A. BEISLER für die Übersendung einer Probe Carpesterol.

gleich (siehe Abb. 16). Die Rf-Werte beider Substanzen stimmen in drei Lösungsmittelsystemen überein (Tabelle 10).

Schmelzpunkt Substanz SM-1	: 252° C
Schmelzpunkt Probe Prof. BEISLER	: 251° C
Mischschmelzpunkt beider Substanzen	: 249° - 251° C

Tab. 9: Vergleich der Schmelzpunkte von SM-1 und Carpesterol

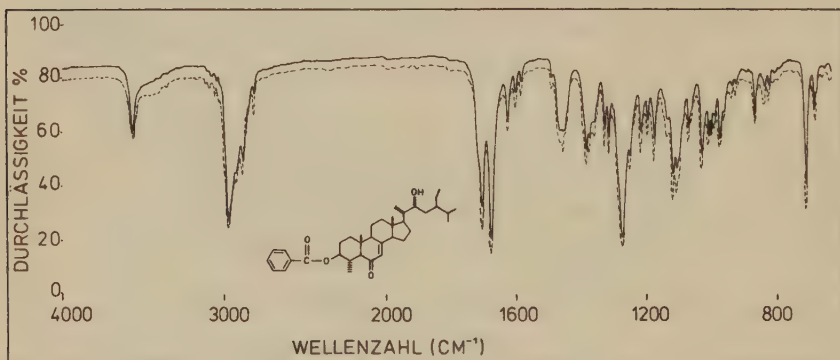


Abb. 16: IR-Überlagerungsspektrum von SM-1 und Carpesterol

	Rf-Werte			Chlorsulfon- säure-Reag.
	I	II	III	
SM-1	0.34	0.50	0.61	gelb
Probe Prof. BEISLER	0.34	0.50	0.61	gelb
Fließmittel: I) Chloroform : Aceton (1:1) II) Toluol : Methanol (95:5) III) Chloroform : Aceton (9:1)				

Tab. 10: DC-Vergleich von SM-1 und Carpesterol

Die experimentellen Ergebnisse erlauben demnach klar folgende Aussage: Bei Substanz SM-1 handelt es sich um das bereits einmal aus *Solanum xanthocarpum* isolierte Carpesterol mit der Konstitution (22R)-22-Hydroxy-6-oxo-4 α -Methyl-5 α -Stigmast-7-en-3 β -yl-Benzoat (siehe Abb. 17).

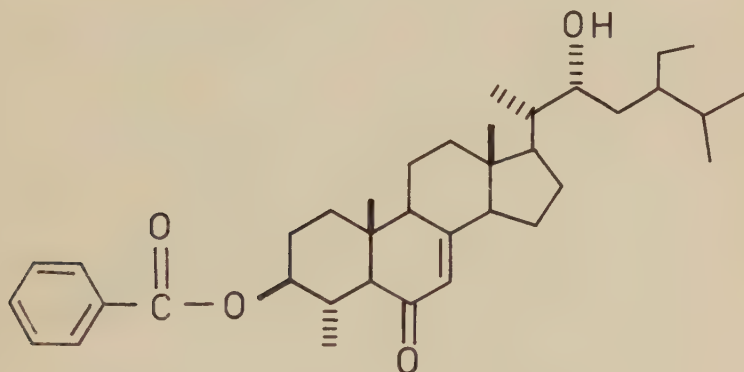


Abb. 17: Carpesterol

Tabelle 11 gibt einen ausführlichen Vergleich der physikalischen Daten von SM-1 mit Carpesterol⁵⁸⁾ wider.

	SM-1	Carpesterol ⁵⁸⁾
Schmp.	252° C	251° C
Bruttoformel	C ₃₇ H ₅₄ O ₄	C ₃₇ H ₅₄ O ₄
Optische Drehung	$[\alpha]_D^{25} = +71^\circ \text{ c}=1.13$	$[\alpha]_D^{27} = +67^\circ \text{ c}=0.716$
MS (Hauptfragmente)	562, 440, 422, 312, 297, 257, 109, 105	562, 544, 529, 501, 440, 422, 403, 312, 297, 257, 109, 105
NMR	8.15-7.29 (5H,m) 5.68 (1H,s) 4.68 (1H,breit,m) 3.74 (1H,breit,m)	8.2-7.3 (5H,m) 5.71 (1H,s) 4.71 (1H,breit,m) 3.76 (1H,breit,m)
IR	3570 1710 1680 1630, 1605, 1585	3590 (OH) 1710 (C=O,Benzoat) 1677 (Ketoenol) 1632, 1607, 1587 cm ⁻¹
UV	$\lambda_{\text{max}}=233 \text{ nm}$ $\epsilon =19700$	$\lambda_{\text{max}}=233 \text{ nm}$ $\epsilon =19400$

Tab. 11: Vergleich der physikalischen Daten von SM-1 mit denen von Carpesterol.

3.7. Identifizierung der Substanz SM-2

3.7.1. Voruntersuchungen und spektroskopische Untersuchungen

Substanz SM-2 kristallisiert aus Methanol in feinen, unscheinbaren Kristallen mit einem Schmelzpunkt von $134^{\circ} - 137^{\circ} \text{ C}$. Substanz SM-2 ist optisch aktiv:

$$[\alpha]_{\text{D}}^{23} = -39^{\circ} \text{ (Pyridin, } c = 0.92 \text{)}$$

Die Summenformel stimmt auf

$\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$ (414.72) Ber.: C 83,99 % H 12.14 %

Gef.: C 83.73 % H 12.08 %

Substanz SM-2 reagiert positiv auf die Reaktion nach LIEBERMANN-BURCHARD (Probe auf Steroide und Triterpene).

Im ultravioletten Bereich zeigt SM-2 keine Adsorption.

Chromophore Gruppen und ein aromatischer Charakter der Verbindung können somit ausgeschlossen werden.

Im IR-Spektrum (Abb. 18) fallen die Banden bei 2970 und

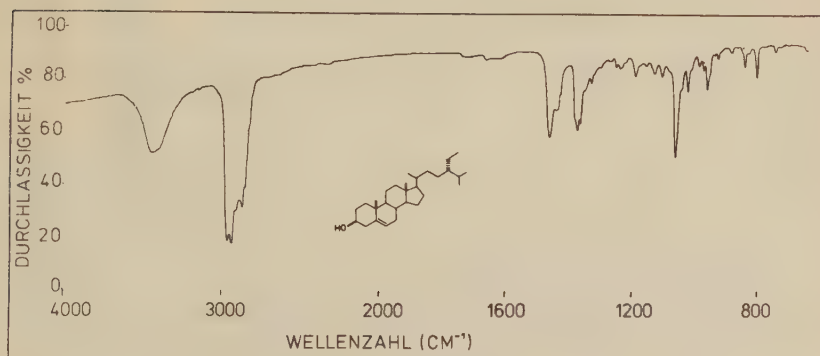


Abb. 18: IR-Spektrum von Substanz SM-2

2940 cm^{-1} (CH-Valenzschwingungen) und bei 1465 und 1375 cm^{-1} (CH-Deformationsschwingungen) auf, die von CH_3 - und $-\text{CH}_2$ -Gruppierungen verursacht werden. Ferner ist die breite Bande bei 3450 cm^{-1} charakteristisch, die auf eine freie OH-Gruppe (OH-Valenzschwingung) hindeutet; dies wird weiter durch eine starke Bande bei 1060 cm^{-1} (C-O-Valenzschwingung) gestützt.

Dem ^1H -NMR-Spektrum (Abb. 19) können weitere Hinweise entnommen werden. Bemerkenswert ist hier vor allem die Konzentration der Signale im Bereich 2.4 - 0.6 ppm(δ), welche in dieser typischen Form von Methylengruppen und den angulären Methylgruppen eines Steroidgerüsts gebildet werden^{60,61,62}. Zwei deutlich unterscheidbare Peaks erheben sich aus dem

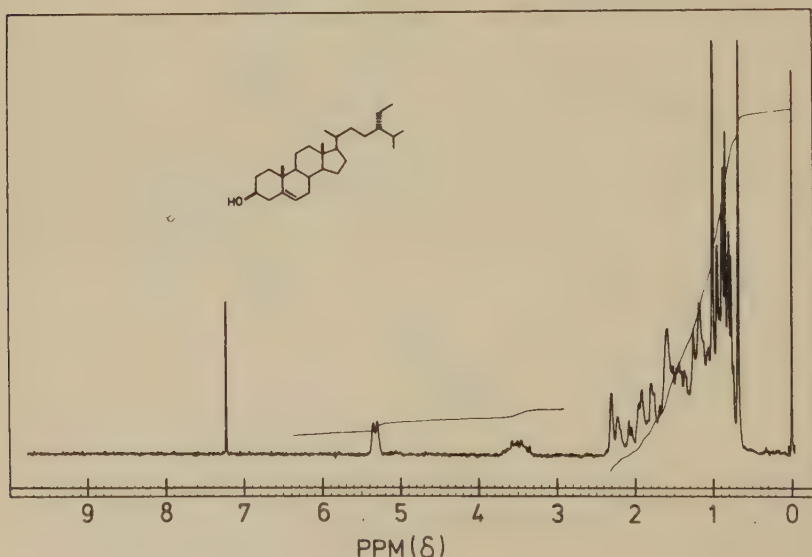


Abb. 19: ^1H -NMR-Spektrum von Substanz SM-2 (in CDCl_3)

Komplex der sich überlagernden Resonanzen. Mit Hilfe der Integration können diese je als Methylgruppen berechnet und den angulären Methylgruppen C-19 ($\delta = 1.02$ ppm) und C-18 ($\delta = 0.66$ ppm) eines Steroids zugeordnet werden.

Die schon aus dem IR-Spektrum gezogene Vermutung, daß im Molekül von SM-2 eine freie OH-Gruppe vorliegt, wird durch das breite Multipllett bei 3.5 ppm(δ) bestätigt, das von dem geminalen Proton der OH-Gruppe gebildet wird. Bei noch tieferem Feld 5.37 ppm(δ) tritt ein weiteres Multipllett auf, über dessen Herkunft jedoch noch keine Schlüsse gezogen werden können.

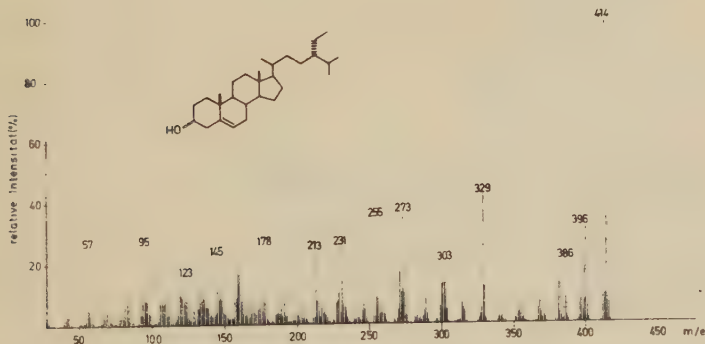


Abb. 20: Massenspektrum von Substanz SM-2

Der massenspektroskopische Zerfall von SM-2 (Abb. 20) gibt die deutlichsten Hinweise zur Identifikation der Substanz. Der Molekülpeak m/e 414 ist gleichzeitig der Basispeak; es ist also keine Stelle im Molekül vorhanden, die die Entstehung von energetisch begünstigten Bruchstücken ermöglicht. Durch Abspaltung von H_2O - siehe auch

den Hinweis aus dem NMR-Spektrum für das Vorliegen einer freien OH-Gruppe - entsteht aus dem Molekülpeak m/e 414 das Bruchstück m/e 396.

Charakteristische Aussagen geben die Ionen m/e 329 und m/e 303. Diese stellen die Fragmente M-85 und M-111 dar, die als Schlüsselbruchstücke für Δ^5 -3-Hydroxysteroidoide gelten^{43,53}). In Abbildung 20 ist die Fragmentierung zu diesen Bruchstücken aufgezeichnet, wobei durch eine komplexe Umlagerungsreaktion die Kohlenstoffatome C-3 und C-7 eliminiert werden^{44,54}). Eine Δ^5 -Doppelbindung ist auch

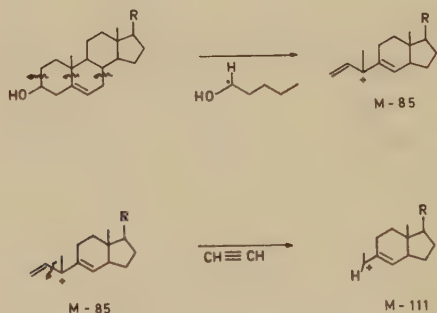


Abb. 21: Entstehung der Fragmente M-85 und M-111.

eine Erklärung für das bei 5.37 ppm(δ) auftretende Multiplett im NMR-Spektrum, das so vom C-6-Proton gebildet wird.

Die Vermutung, daß bei der Substanz SM-2 ein Δ^5 -3-Hydroxy-Steroidgrundgerüst vorliegt, wird durch das Ion m/e 273 und dem wasserabgespaltenen Fragment m/e 255 bewiesen. Hier ist die Seitenkette an C-17 abgespalten,

so daß diese Bruchstücke dem Steroid-Grundkörper zuzuordnen sind. Daraus folgt, daß die Seitenkette das Ion m/e 141 mit der Zusammensetzung $C_{10}H_{21}$ darstellt. Diese Differenz läßt sich unter biogenetischen Gesichtspunkten nur einer Seitenkette zuordnen, die am C-24 äthyl-substituiert ist, welches durch das Ion m/e 84 (C_6H_{12} -Abspaltung) bewiesen wird.

Die wichtigsten Fragmente im massenspektroskopischen Verhalten von SM-2 sind in Abb. 22 zusammengefaßt^{62,63}).

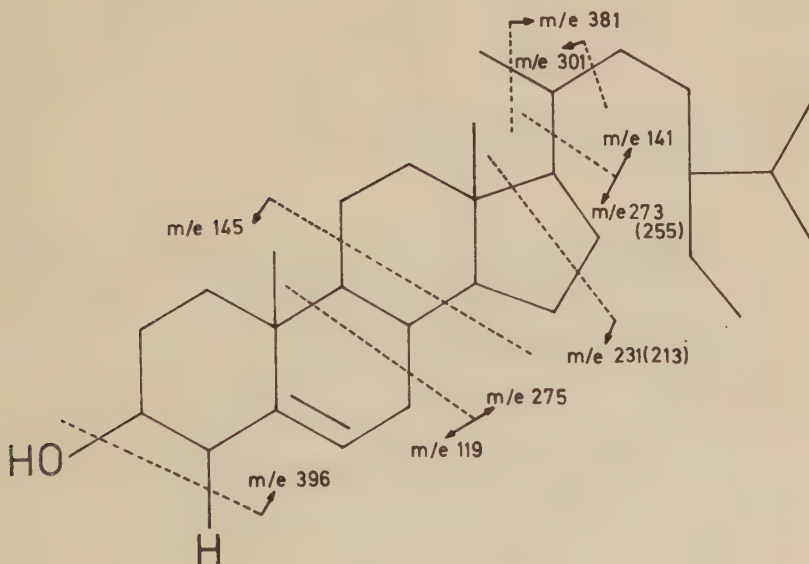


Abb. 22: Massenspektroskopisches Fragmentierungsschema von SM-2.

Auf Grund der Hinweise aus IR-, NMR- und Massenspektrum liegt bei der Substanz SM-2 ein 3-Hydroxy- Δ^5 -Steroid vor mit einer Seitenkette an C-17, die aus einem $C_{10}H_{21}$ -Körper ohne Doppelbindungsäquivalent besteht und am C-24 äthylsubstituiert ist. Bei DEVON/SCOTT⁶⁴⁾ und FIESER/FIESER⁶⁵⁾ sind 2 Steroide mit diesen Bedingungen zu finden: β -Sitosterol und das dazu stereoisomere Clionasterin.

Tabelle 12 zeigt einen Vergleich der Schmelzpunkte und der optischen Drehung beider Substanzen.

	Schmelzpunkt	optische Drehung
β -Sitosterol	137°	$[\alpha]_D^{20} = -37^\circ$ (CHCl ₃)
Clionasterin	138°	$[\alpha]_D^{20} = -43^\circ$ (CHCl ₃)

Tab. 12: Vergleich der Schmelzpunkte und der optischen Drehung von β -Sitosterol und Clionasterin.

3.7.2. Vergleich von SM-2 mit Stigma-5-en-3 β -ol (β -Sitosterol)

Zum Vergleich von SM-2 wird eine authentische Probe von β -Sitosterol* herangezogen.

Wie Tabelle 13 wiedergibt, zeigt der Schmelzpunkt einer Verreibung aus beiden Substanzen keine Depression.

Schmelzpunkt Substanz SM-2	: 134° - 137° C
Schmelzpunkt β -Sitosterol	: 135° - 137° C
Mischschmelzpunkt beider Substanzen	: 134° - 137° C

Tab. 13: Vergleich der Schmelzpunkte von SM-2 und β -Sitosterol

* Handelsprodukt der Fa. Merck

Im IR-Überlagerungsspektrum sind die Kurven beider Substanzen deckungsgleich:

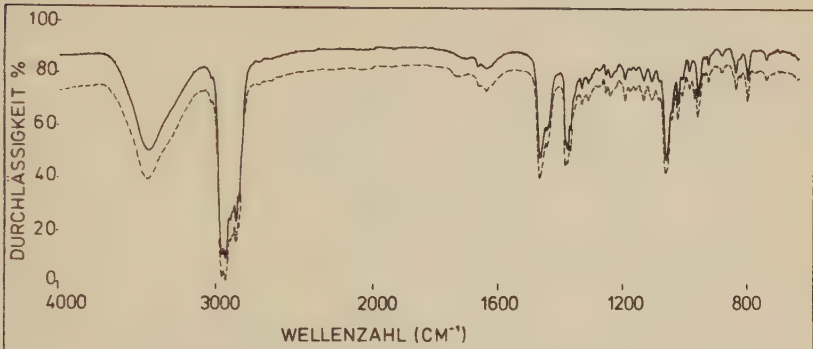


Abb. 23: IR-Überlagerungsspektrum von SM-2 und β -Sitosterol

	Rf-Werte		Chlorsulfon- säure-Reag.
	I	II	
SM-2	0.42	0.60	braun
β -Sitosterol	0.42	0.60	braun
Fließmittel: I) Chloroform : Aceton (9:1) II) Cyclohexan : Äthylacetat (3:7)			

Tab. 14: DC-Vergleich von SM-2 und β -Sitosterol.

Die experimentellen Ergebnisse erlauben folgende Aussage:
Bei der aus *Solanum marginatum* isolierten Substanz SM-2
handelt es sich um Stigma-5-en-3 β -ol (β -Sitosterol).

3.8. Identifizierung der Substanz SM-3

3.8.1. Voruntersuchungen, Hydrolyse und spektroskopische Untersuchungen

Substanz SM-3 kristallisiert aus Aceton in feinen, unregelmäßigen Plättchen. Der Schmelzbereich liegt bei 292° - 295° C. Substanz SM-3 ist optisch aktiv:

$$[\alpha]_D^{23} = -40^{\circ} \text{ (Pyridin, } c = 0.96 \text{)}$$

Die Summenformel stimmt auf

$C_{35}H_{60}O_6$ (576.87) Ber.: C 72.87 % H 10.48 %

Gef.: C 72.71 % H 10.46 %

Wie schon die Substanzen SM-1 und SM-2 reagiert auch SM-3 positiv auf die Reaktion nach LIEBERMANN-BURCHARD.

Nach Anfertigung des IR-, NMR- und Massenspektrums ist eine deutliche Ähnlichkeit mit den Spektren von SM-2 zu erkennen. Im IR-Spektrum (Abb. 24) fallen besonders auf:

- (1) die typischen Banden der Methyl- und Methylengruppen bei 2940 cm^{-1} (CH-Valenzschwingungen), 1465 cm^{-1} und 1365 cm^{-1} (CH-Deformationsschwingungen), die auf ein Steroidgrundgerüst hinweisen,
- (2) die von mehreren freien OH-Gruppen stammende sehr breite Bande bei 3420 cm^{-1} (OH-Valenzschwingung) und die ausgeprägte Bande zwischen $1100\text{-}1000 \text{ cm}^{-1}$ (C-O-Valenzschwingung), welche z.B. für den Zuckeranteil eines Glykosides charakteristisch ist,
- (3) eine starke Bande bei 1745 cm^{-1} , die jedoch als Verunreinigung durch das Umkristallisationsmittel (Aceton) gedeutet wird.

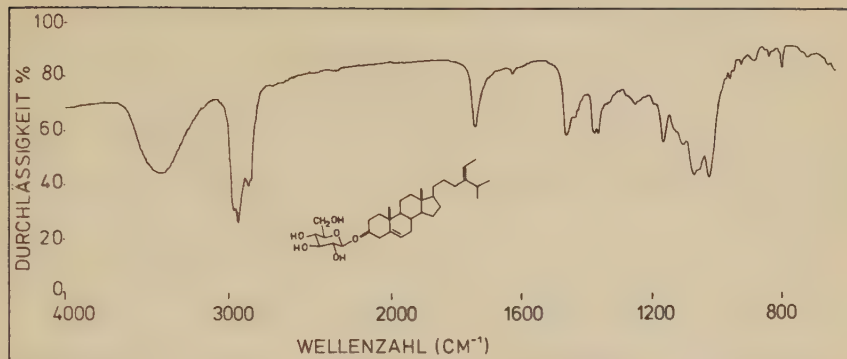


Abb. 24: IR-Spektrum von Substanz SM-3.

Im Massenspektrum (Abb. 25) ist ein deutlicher Molpeak nicht zu erkennen, was wiederum für das Vorliegen eines Glykosides spricht. Das erste stärker erscheinende Fragment m/e 414 wird deshalb als Molpeak des Aglykons interpretiert. Der Basispeak entsteht durch Abspaltung von H_2O aus dem

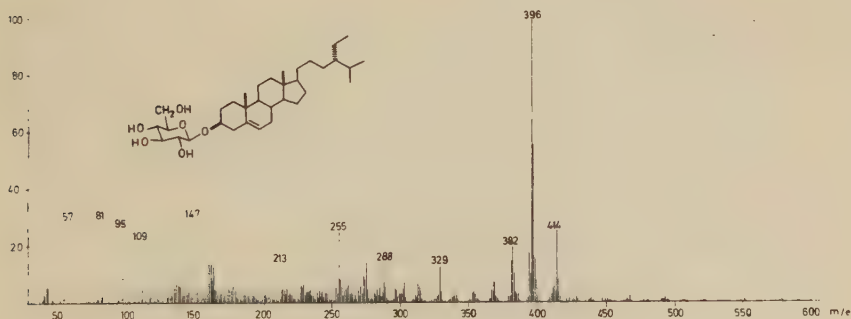


Abb. 25: Massenspektrum von Substanz SM-3.

Aglykon ($414 - 18 = 396$) - typisch für eine O-glykosidische-Bindung. Auffallend ist, daß die Ionen m/e 329, m/e 255, m/e 213 und m/e 95, die für β -Sitosterol (SM-2) charakteristisch sind, auch hier klar hervortreten. Es liegt daher die Vermutung nahe, daß die Substanz SM-3 ein β -Sitosterol-Glykosid darstellt.

Dies wird durch saure Hydrolyse der Substanz SM-3 und dünnschichtchromatographische Identifizierung der hydrolytischen Spaltprodukte nachgewiesen:

	Rf-Wert	Tgl.	254 nm	366 nm
Hydrolyseprodukt aus SM-3	0.41	braun	grau-violett	braun
Cochromatographie β -Sitosterol*	0.41	braun	grau-violett	braun
Fließmittel: Chloroform : Aceton (9:1) Detektion: Chlorsulfonsäure (Reagens-Nr. 49 ⁴⁵) * Handelsprodukt der Fa. Merck				

Tab. 15: DC-Identifizierung des Aglykons von Substanz SM-3 nach Hydrolyse.

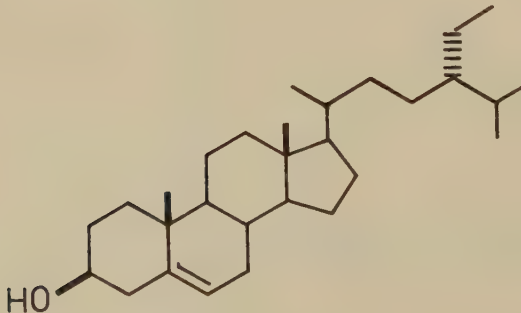


Abb. 26: β -Sitosterol

Die Hydrolyselösung wird anschließend in dem Gemisch Äthylacetat/Wasser ausgeschüttelt. Nach Verdampfen i.V. des organischen Lösungsmittels bleibt ein Rückstand mit einem Schmelzpunkt von $131^{\circ} - 133^{\circ} \text{ C}$ zurück. Nach Vermischen mit einer authentischen Probe β -Sitosterol liegt der Mischschmelzpunkt bei $133^{\circ} - 135^{\circ} \text{ C}$. Ein IR-Überlagerungsspektrum mit β -Sitosterol ergibt in allen Einzelheiten eine Übereinstimmung. Das Aglykon der Substanz SM-3 ist daher mit β -Sitosterol identisch.

Die Zuckerkomponente der Substanz SM-3 wird nach COUNE und DENOEL⁶⁶⁾ dünnschichtchromatographisch analysiert:

	Rf-Wert	Farbe
Hydrolyseprodukt aus SM-3	0.33	blau
Cochromatographie		
L-Rhamnose	0.78	violett
D-Xylose	0.56	grau blau
D-Glukose	0.33	blau
D-Galaktose	0.26	grau blau
Fließmittel: n-Butanol : Pyridin : Wasser (90:50:20)		
Detektion: α -Naphtol-Schwefelsäure (Reagens-Nr. 163 ⁴⁵⁾)		

Tab. 16: Identifizierung der Zuckerkomponente von SM-3 nach Hydrolyse.

Das NMR-Spektrum von Substanz SM-3 (Abb. 27) ähnelt im Bereich $2.2 - 0.5 \text{ ppm}(\delta)$ dem NMR-Spektrum von SM-2 (Abb. 19). Es zeigt die sich überlagernden Resonanzen eines Steroidgrundgerüsts mit den deutlichen angulären Methylgruppen C-18 ($\delta = 0.68 \text{ ppm}$) und C-19 ($\delta = 0.96 \text{ ppm}$). Das breite

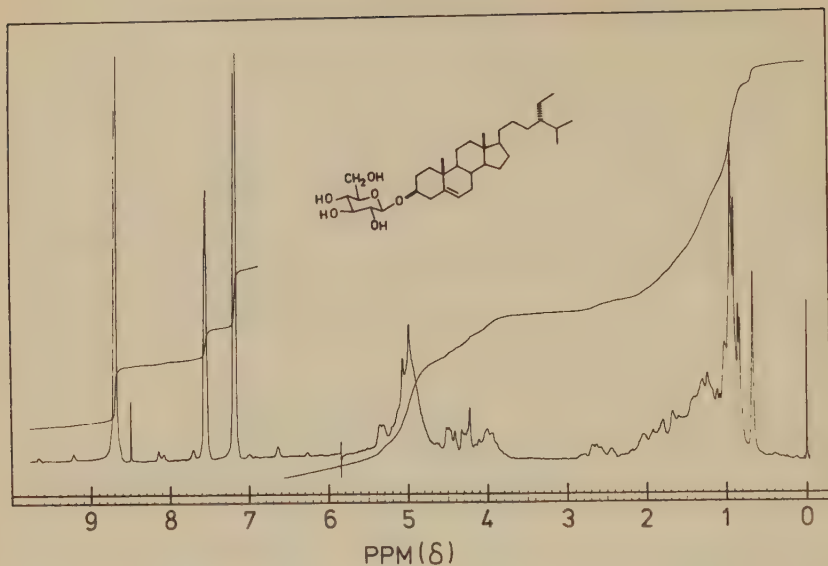


Abb. 27: ¹H-NMR-Spektrum von Substanz SM-3 (in Pyridin-d₅)

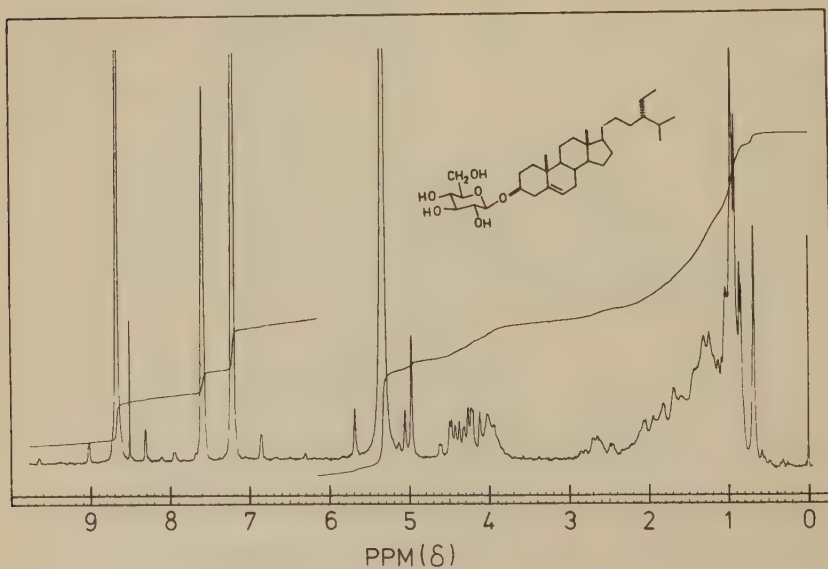


Abb. 28: ¹H-NMR-Spektrum von Substanz SM-3 (in Pyridin-d₅) nach H/D-Austausch.

Multipllett des Protons an C-3 des Steroidgrundgerüstes erscheint im Spektrum von SM-3 bei $\delta = 2.65$ ppm, das Signal des Protons an C-6 des Aglykons bei 5.35 ppm(δ). Der für ein Zuckermolekül charakteristische breite Komplex mit vielfachen Aufspaltungen tritt im Bereich 5.0 - 3.9 ppm(δ) auf. Das dem Proton an C-1 der D-Glukose zugeordnete Dublett bei 5.04 ppm(δ) weist eine Kopplungskonstante von $J = 7$ Hz auf. Diese Kopplungskonstante wird durch die vicinale Kopplung des axial stehenden Protons an C-1 mit dem axial stehenden Proton an C-2 der D-Glukose hervorgerufen⁴⁹). Diese axial-axiale Kopplung des anomeren Protons beweist, daß das β -Sitosterin β -glykosidisch mit dem Zucker (D-Glukose) verknüpft ist.

3.8.2. Acetylierung von Substanz SM-3

Einen endgültigen Beweis für das Vorliegen von β -Sitosterin- β -D-Glukose liefern die Daten der acetylierten Substanz SM-3. Durch Acetylierung mit Essigsäureanhydrid in Pyridin, bei der alle primären und sekundären Hydroxylgruppen verestert werden, sollten bei SM-3 vier Acetoxy-Gruppen zu erwarten sein. Die vollständig umgesetzte Substanz SM-3 (keine OH-Bande im IR-Spektrum) kristallisiert aus Methanol in langen Nadeln mit einem Schmelzbereich von $167^{\circ} - 169^{\circ}$ C.

Das NMR-Spektrum der acetylierten Substanz SM-3 (Abb. 29) zeigt im Bereich 2.1 - 2.0 ppm(δ) vier Singulettts von Methylgruppen aus Acetoxy-Gruppen stammend. Dies bestätigt oben beschriebene Postulierung. Diese vier OH-Gruppen sind

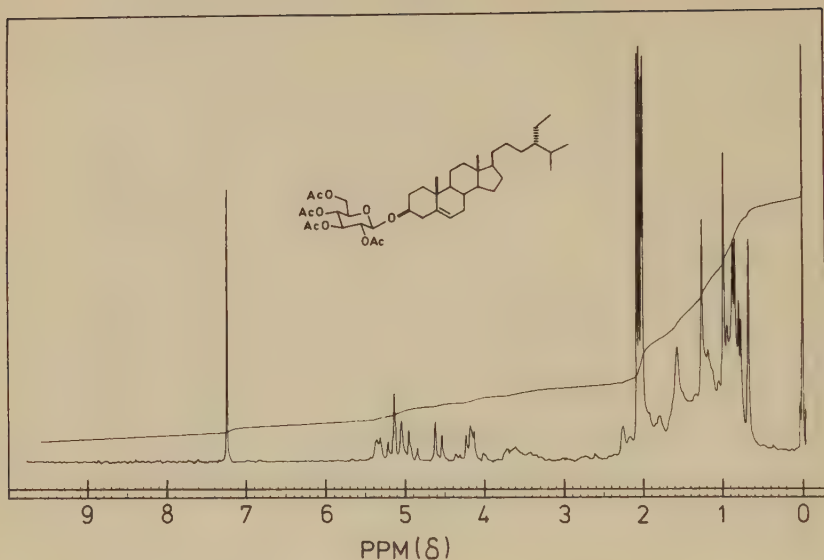


Abb. 29: ¹H-NMR-Spektrum von Substanz SM-3-acetyliert (in CDCl₃)

alle im Zuckerbereich des Glykosids SM-3 lokalisiert.

Das Vorliegen eines Tetraacetats nach Acetylierung der Substanz SM-3 bestätigt auch das Massenspektrum. Der Molpeak ist bei m/e 744 beobachtbar. Eine Abspaltung von Essigsäure (60 Masseneinheiten) wiederholt sich viermal. Als Molpeak des Aglykons β-Sitosterol ist m/e 414 zu beobachten. Im unteren Massenbereich treten die typischen Fragmente m/e 331, m/e 271, m/e 229, m/e 211, m/e 169, m/e 127 und m/e 109 der acetylierten Glukose auf^{83,84}).

Die experimentellen Ergebnisse erlauben demnach klar folgende Aussage: Bei der aus *Solanum marginatum* isolierten Substanz SM-3 handelt es sich um β-Sitosterin-β-D-Glukose.

3.8.3. Vergleich von SM-3 mit authentischer β -Sitosterol- - β -D-Glukose

Wie zuvor beschrieben, sprechen alle Daten dafür, daß Substanz SM-3 mit β -Sitosterol- β -D-Glukose identisch ist, ein Naturstoff, der schon mehrfach in der Literatur beschrieben worden ist (siehe Tabelle 17).

SM-3	β -Sitosterol- - β -D-Glukose	Lit.
Bruttoformel:		
$C_{35}H_{60}O_6$	$C_{35}H_{60}O_6$	
Schmelzpunkt:		
$292^{\circ} - 295^{\circ} C$	$290^{\circ} - 291^{\circ}$	68)
	$288^{\circ} - 290^{\circ}$	67)
	$295^{\circ} - 298^{\circ}$	69)
Optische Drehung:		
$[\alpha]_D^{23} = -40^{\circ}$ (Pyridin)	$[\alpha]_D^{21} = -46^{\circ}$ (Pyridin)	68)

Tab. 17: Gegenüberstellung der Daten von SM-3 und denen von authentischer β -Sitosterol- β -D-Glukose.

3.9. Identifizierung der Substanz SM-4

3.9.1. Voruntersuchungen, Hydrolyse und spektroskopische Untersuchungen

Substanz SM-4 kristallisiert aus 75%igem Äthanol in feinen Nadeln mit einem Schmelzpunkt von 300° C.

Die Substanz ist optisch aktiv:

$$[\alpha]_D^{20} = -94^\circ \text{ (Methanol, } c = 0.96)$$

$$[\alpha]_D^{20} = -95^\circ \text{ (Pyridin, } c = 1.18)$$

Gemäß Massenspektrum (Feld-Desorptions-Spektrum) hat die Substanz ein Molekulargewicht von 867, was in Verbindung mit dem Ergebnis der CHN-Analyse auf die Bruttoformel

$C_{45}H_{73}O_{15}N$ (868.04) hinweist.

$C_{45}H_{73}O_{15}N$ (868.04) Ber.: C 62.26% H 8.48% N 1.61%

Gef.: C 60.81% H 8.52% N 1.62%

Eine Berechnung unter zusätzlicher Berücksichtigung von 1 Mol Kristallwasser bringt folgendes Ergebnis:

$C_{45}H_{73}O_{15}N \times H_2O$ (886.10)

Ber.: C 60.99% H 8.53% N 1.58%

Gef.: C 60.81% H 8.52% N 1.62%

Substanz SM-4 reagiert sowohl gegenüber dem Chlorsulfonsäure-Reagens (Reagens-Nr. 49⁴⁵) als auch dem Dragendorff-Reagens (Reagens-Nr. 89⁴⁵) positiv, was charakteristisch für Steroidalkaloide vom Typus der Spirosolane ist.

Im Fließmittel $CHCl_3 : C_2H_5OH : NH_3$ (1%ig) (20:20:10, untere Phase) wandert bei der DC-Untersuchung SM-4 im Vergleich zu den später zu beschreibenden Substanzen SM-5

und SM-6 am raschesten, stellt demnach von diesen drei Substanzen die lipophilste dar.

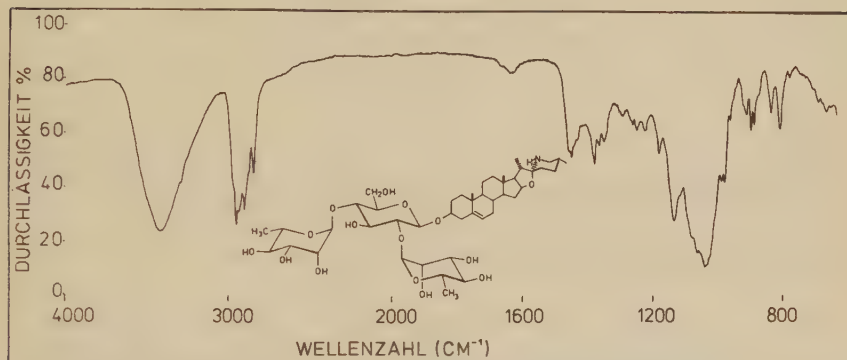


Abb. 30: IR-Spektrum von Substanz SM-4

Vergleicht man das IR-Spektrum der Substanz SM-4 (Abb. 30) mit dem des Carpesterols (Abb. 9), so fällt das Vorkommen von folgenden Signalen auf:

- (1) Die sehr breite OH-Bande bei ca. 3400 cm^{-1} (OH-Valenzschwingungen) mit den ausgeprägten C-O-Valenzschwingungen bei etwa 1100 cm^{-1} , die auf eine große Anzahl freier OH-Gruppen hinweisen, wie sie z.B. in Zuckern vorhanden sind.
- (2) Außerdem sind die für ein Steroid typischen Banden bei 2940 cm^{-1} (C-H-Valenzschwingungen), 1455 cm^{-1} (C-H-Deformationsschwingung) und 1380 cm^{-1} (CH_3 -Deformationsschwingung) vorhanden.

Im einfachen Massenspektrum (Abb. 31) ist ein eindeutiger Molpeak nicht auszumachen – typisch für das Verhalten von Glykosiden. Nur mit Hilfe eines Feld-Desorptions-Spektrums

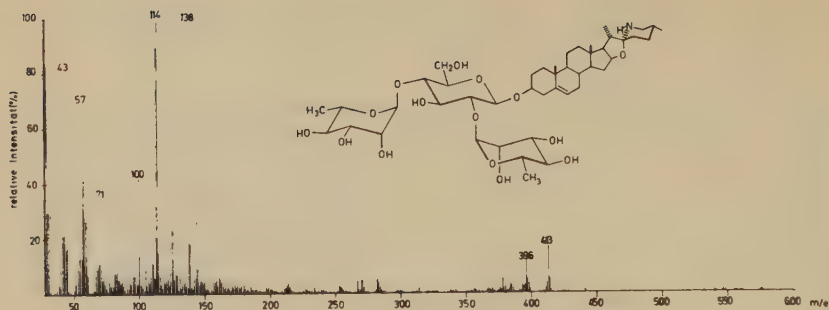


Abb. 31: Massenspektrum von Substanz SM-4

kann ein Molpeak bei m/e 867 beobachtet werden. Das erste deutliche Signal des Massenspektrums von SM-4 erscheint bei m/e 413. Unter der Annahme, daß es sich bei SM-4 um ein Glykosid des Solasodins handelt, was auf Grund der älteren Untersuchungen von BRIGGS durchaus plausibel ist, läßt sich das Fragment bei m/e 413 als Molpeak des Aglykons (= Solasodin) interpretieren. (Zur Interpretation des Aglykons Solasodin siehe Seite 99 dieser Arbeit). Auch die zwei anderen auffallenden Fragmente m/e 138 und m/e 114 sind dem Aglykon zuzuordnen.

Aus der Differenz: Molpeak des Glykosids minus Molpeak des Aglykons ($867 - 413 = 454$) können wir schließen, daß der Zuckeranteil der Substanz SM-4 ein Trisaccharid darstellen muß. Diese durchaus plausible Annahme ist nunmehr experimentell zu belegen: durch Hydrolyse des Glykosids und Identifizierung der hydrolytischen Spaltprodukte.

Nach COUNE und DENOEL⁶⁶⁾ werden dünnschichtchromatographisch als Zuckerkomponente nachgewiesen:

	Rf-Wert	Farbe
Hydrolyseprodukt aus SM-4	0.78	violett
	0.33	blau
Cochromatographie		
L-Rhamnose	0.78	violett
D-Xylose	0.56	grau blau
D-Glukose	0.33	blau
D-Galaktose	0.26	grau blau
Fließmittel: n-Butanol : Pyridin : Wasser (90:50:20) Detektion: α -Naphtol-Schwefelsäure (Reagens-Nr. 163 ⁴⁵⁾)		

Tab. 18: Identifizierung der Zuckerkomponente von SM-4
nach Hydrolyse

3.9.2. Die aglykonischen Hydrolyseprodukte der Substanz SM-4

Die aglykonischen Hydrolyseprodukte von Substanz SM-4 sind identisch mit denen von den Substanzen SM-5 und SM-6 und werden unter Cochromatographie von Solasodin* zunächst nur dünnschichtchromatographisch geprüft. Es wird eine mit authentischem Solasodin gleiches Verhalten zeigende Substanz nachgewiesen und daneben eine zweite, stärker lipophile Substanz:

* Handelsprodukt der Fa. Roth

	Rf-Wert	Dragendorff- reagens
Hydrolyseprodukt SM-4, SM-5, SM-6	0.50	positiv
	0.38	positiv
Cochromatographie Solasodin	0.38	positiv
Fließmittel: Chloroform : Aceton (90:10)		

Tab. 19: Identifizierung des Aglykons der Substanzen SM-4, SM-5 und SM-6 nach Hydrolyse

Die beiden aglykonischen Hydrolyseprodukte sind ab Seite 98 dieser Arbeit genau beschrieben.

3.9.3. Untersuchung des Trisaccharid-Anteils von SM-4

Auf Grund der oben beschriebenen, orientierenden Untersuchungen liegt die Schlußfolgerung nahe, es könne sich bei der von uns isolierten Substanz SM-4 um das seinerzeit von L.H. BRIGGS⁹⁾ beschriebene Solamargin handeln. Die Daten der beiden Glykoside sind auf Seite 74 vergleichend aufgeführt.

In Ergänzung der bisherigen Beweisführung zur Konstitution des Solamargins haben wir zusätzlich eine genaue Interpretation der ¹H-NMR-Spektren durchgeführt.

Die NMR-Spektren (Abb. 32, Abb. 33) zeigen im Bereich 2.5 - 0.5 ppm(δ) die sich überlagernden Resonanzen eines Steroidgrundgerüsts mit den deutlichen angulären Methylgruppen 18-CH₃ (0.89 ppm) und 19-CH₃ (1.06 ppm). Besonders auffallend in diesem Bereich sind jedoch zwei Dubletts bei

1.64 ppm(δ) mit $J = 7$ Hz und bei 1.77 ppm(δ) mit $J = 6$ Hz. Wir ziehen ein bei SIMONS und ZANGER⁴⁹⁾ gefundenes, in D₂O aufgenommenes NMR-Vergleichsspektrum von L-Rhamnose heran und beobachten, daß L-Rhamnose im Bereich um etwa 1.5 ppm(δ) ein Dublett mit $J = 6$ Hz (von der C-6-Methylgruppe) und ein breites Singulett mit $J = 1.5$ Hz im Bereich über 5.0 ppm(δ) aufweist. Auf das NMR-Spektrum von SM-4 übertragen bedeutet dies, daß der Zuckeranteil dieses Glykosids aus 2 Mol L-Rhamnose besteht, denn wir finden ein verbreitertes Singulett bei $\delta = 6.39$ ppm(δ) mit einer Kopplungskonstante von etwa $J = 2$ Hz und ein zweites breites Singulett bei $\delta = 5.84$ ppm(δ) mit $J = 1.5$ Hz, dazu die beiden schon oben beschriebenen Dubletts bei ca. 1.7 ppm(δ).

Berücksichtigt man das früher ermittelte Ergebnis der Hydrolyse, daß neben L-Rhamnose noch D-Glukose dünnstschichtchromatographisch nachweisbar war, läßt sich aus dem NMR-Spektrum folgern, daß das Triosid aus 2 Mol L-Rhamnose und 1 Mol D-Glukose aufgebaut sein muß.

Aus dem NMR-Spektrum kann man zusätzlich noch entnehmen, daß der Glukoseteil β -glykosidisch gebunden ist. Das am acetalischen Kohlenstoff stehende C-1-Proton ($\delta = 4.82$ ppm [Pyridin-d₅] 1 H) weist eine Kopplung von $J = 7$ Hz auf. In Übereinstimmung mit den experimentellen Angaben der Literatur⁴⁹⁾ ($\delta = 4.6$ ppm [D₂O] 1 H, $J = 7.2$ Hz) und in Übereinstimmung mit der KARPLUS-Gleichung sind die Protonen an C-1 und C-2 jeweils axial im Pyranose-Ring angeordnet.

Es bleibt nunmehr zu klären, wie diese drei Zucker (2 Mol L-Rhamnose und 1 Mol D-Glukose) miteinander verknüpft

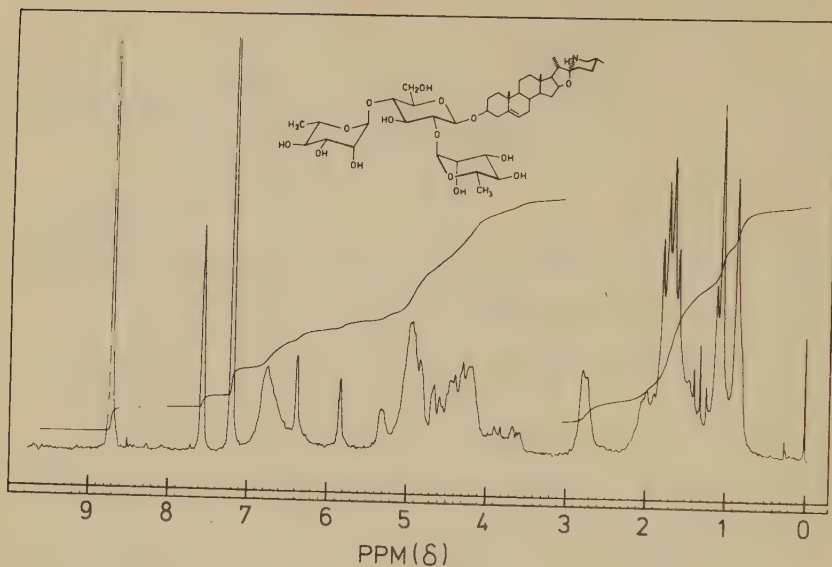


Abb. 32: ^1H -NMR-Spektrum von Substanz SM-4 (in Pyridin- d_5).

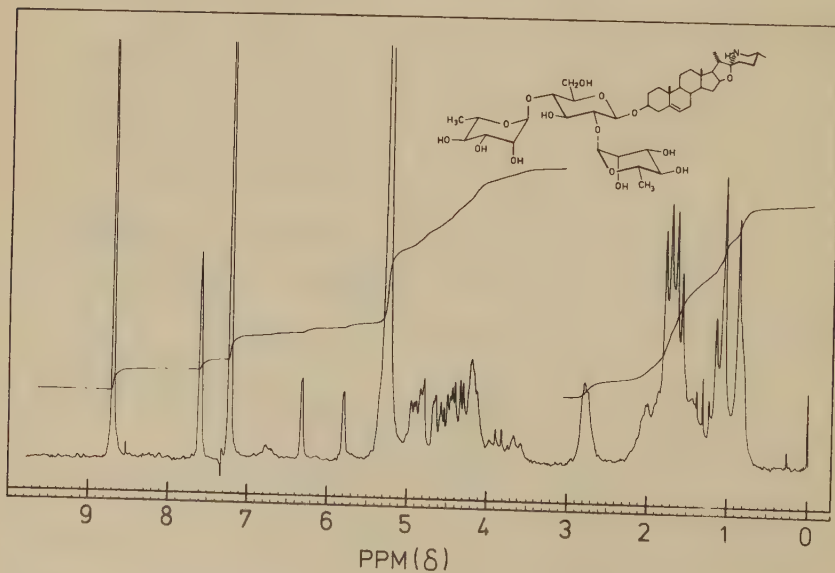


Abb. 33: ^1H -NMR-Spektrum von Substanz SM-4 (in Pyridin- d_5) nach H/D-Austausch.

sind. Diese Frage lösen wir mittels ^1H -NMR-Spektroskopie auf rein empirischem Wege mit Hilfe der grundlegenden Arbeit von G.A. HOYER⁷⁰⁾, der die NMR-Spektren zahlreicher Tri- und Tetrasaccharide des Diosgenins interpretiert. Hier findet sich unter anderem ein Diosgenin-Triosid mit 2 Mol L-Rhamnose und 1 Mol D-Glukose im Molekül und zwar das Diosgenin-3-O- α -L-Rhamnopyranosido-(1 $\rightarrow$ 4)- α -L-Rhamnopyranosido-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Glucopyranosyl (= Dioscin). Ein Vergleich der auf den Zuckeranteil entfallenden Signale mit denen unserer Substanz SM-4 zeigt, daß diese innerhalb der Fehlergrenzen deckungsgleich sind.

	Chemische Verschiebung in ppm(δ)	
	SM-4	Dioscin
C-1-Proton der Glukose	4.82	4.87
C-1-Proton der Rhamnose	6.39	6.27
C-1-Proton der Rhamnose	5.84	5.74

Tab. 20: Chemische Verschiebung der C-1-Protonen des Triosids bei Substanz SM-4 und Dioscin

Es liegt daher nahe, für beide Substanzen die gleiche Konfiguration des Zuckeranteils zu postulieren.

Zusammenfassend ergibt sich: Der Vergleich der NMR-Spektren von SM-4 mit denen der Literatur^{49,70)} führt zur Konstitution eines Solasodin-3-O- α -L-Rhamnopyranosido-(1 $\rightarrow$ 4)- α -L-Rhamnopyranosido-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Glucopyranosyl (Abb. 34).

3.9.4. Vergleich von SM-4 mit authentischem Solamargin

Wie zuvor beschrieben sprechen alle Daten dafür, daß Substanz SM-4 wie folgt vorliegt: (3 β ,22R,25R)-Spirosol-5-en-3-yl-O- α -L-Rhamnopyranosido-(1 $\rightarrow$ 2)-O- α -L-Rhamnopyranosido-(1 $\rightarrow$ 4)-O- β -D-Glukopyranosyl. Ein Naturstoff dieser Konstitution ist in der Literatur unter der Bezeichnung Solamargin beschrieben.

SM-4	Solamargin	Lit.
Bruttoformel:		
C ₄₅ H ₇₃ NO ₁₅	C ₄₅ H ₇₃ NO ₁₅	
Schmelzpunkt:		
300° C	300° - 305° C	71)
	301° - 303° C	72)
Optische Drehung:		
$[\alpha]_D^{20} = -94^\circ$ (Methanol)	$[\alpha]_D = -96^\circ$ (Methanol)	71)
$[\alpha]_D^{20} = -95^\circ$ (Pyridin)	$[\alpha]_D^{25} = -98^\circ$ (Pyridin)	25)

Tab. 21: Gegenüberstellung der Daten von SM-4 und denen von authentischem Solamargin.

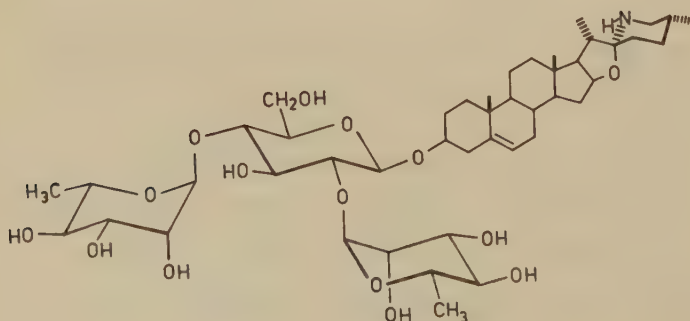


Abb. 34: Solamargin

3.10. Identifizierung der Substanz SM-5

3.10.1. Voruntersuchungen, Hydrolyse und spektroskopische Untersuchungen

Substanz SM-5 kristallisiert aus 96%igem Äthanol in feinen Nadeln mit einem Schmelzbereich von $286^{\circ} - 288^{\circ} \text{ C.}$ Die Substanz ist optisch aktiv:

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -75^{\circ} \text{ (Methanol, } c = 1.03)$$

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -82^{\circ} \text{ (Pyridin, } c = 1.07)$$

Gemäß Massenspektrum (Feld-Desorptions-Spektrum) hat die Substanz SM-5 ein Molekulargewicht von 883, was in Verbindung mit dem Ergebnis der C-H-N-Analyse auf eine Bruttoformel $\text{C}_{45}\text{H}_{73}\text{O}_{16}\text{N}$ (883.49) hinweist.

$\text{C}_{45}\text{H}_{73}\text{O}_{16}\text{N}$ (883.49)	Ber.:	C 61.14%	H 8.32%	N 1.58%
	Gef.:	C 60.99%	H 8.40%	N 1.52%

Genau wie Substanz SM-4 reagiert auch SM-5 sowohl gegenüber dem Chlorsulfonsäure-Reagens (Reagens-Nr. 49⁴⁵) als auch dem Dragendorff-Reagens (Reagens-Nr. 89⁴⁵) positiv - charakteristisch für Steroidalkaloide vom Typus der Spirosolane.

Im Fließmittel $\text{CHCl}_3 : \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} : \text{NH}_3$ (1%ig) (20:20:10, untere Phase) beobachten wir einen Rf-Wert von 0.31. SM-5 stellt daher gegenüber SM-4 (Rf = 0.44) den stärker polaren und gegenüber der später noch zu beschreibenden Substanz SM-6 (siehe Seite 83) den stärker lipophileren Zellinhaltsstoff von *Solanum marginatum* dar.

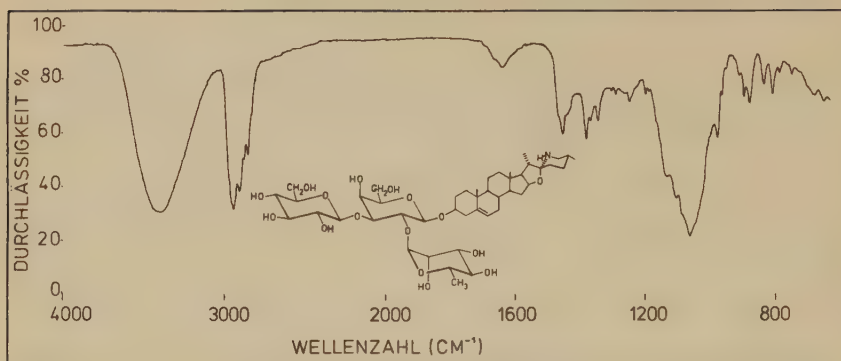


Abb. 35: IR-Spektrum von Substanz SM-5

Das IR-Spektrum von SM-5 (Abb. 35) ist dem von Substanz SM-4 sehr ähnlich:

- (1) Eine sehr breite Bande bei etwa 3400 cm^{-1} und die starken C-O-Valenzschwingungen bei 1150 cm^{-1} bis 1000 cm^{-1} weisen darauf hin, daß bei SM-5 ein Molekül mit Zuckeranteil, also ein Glykosid, vorliegt.
- (2) Die typischen Steroid-Banden bei 2950 cm^{-1} (C-H-Valenzschwingungen), 1450 cm^{-1} (C-H-Deformationsschwingungen) und 1380 cm^{-1} (CH_3 -Deformationsschwingungen) werden von dem Aglykon des Glykosids hervorgerufen.

Aus dem einfachen Massenspektrum (Abb. 36) können wir die gleichen Schlüsse ziehen wie aus dem Massenspektrum von SM-4. Es wird sich bei der Substanz SM-5 um ein Glykosid handeln, da kein eindeutiger Molpeak zu erkennen ist. Wieder liegt der erste deutliche Peak bei $m/e\ 413$, das (siehe Seite 99) als Molpeak des Aglykons(= Solasodin) interpretiert werden kann. Auch im Massenspektrum von SM-5 fallen die dem Aglykon von SM-4 zugeordneten Fragmente $m/e\ 138$ und $m/e\ 114$ auf.

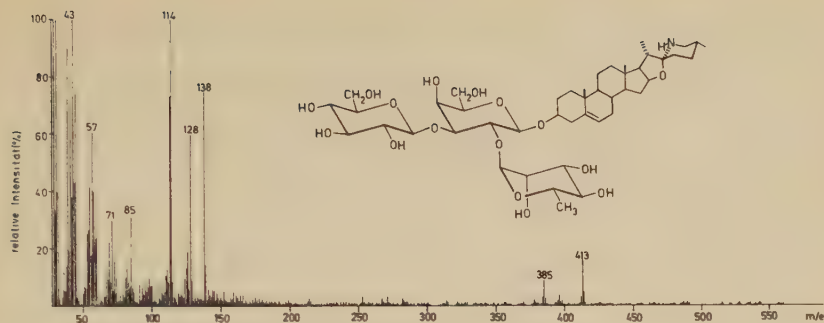


Abb. 36: Massenspektrum von Substanz SM-5

Erst mit Hilfe eines Feld-Desorptions-Spektrums ist ein Molpeak des Glykosids SM-5 bei m/e 883 beobachtbar. Aus der Differenz: Molpeak SM-5 minus Molpeak Aglykon ($884 - 413 = 471$) können wir schließen, daß der Zuckeranteil aus einem Tri-saccharid besteht.

Zur Identifizierung des Triosids und des Aglykons (siehe Seite 66 und 99) hydrolisieren wir Substanz SM-5 und untersuchen die hydrolytischen Spaltprodukte dünnschichtchromatographisch.

	RF-Wert	Farbe
Hydrolyseprodukt aus SM-5	0.78	violett
	0.33	blau
	0.26	graublau
Cochromatographie		
L-Rhamnose	0.78	violett
D-Xylose	0.56	graublau
D-Glukose	0.33	blau
D-Galaktose	0.26	graublau
Fließmittel: n-Butanol : Pyridin : Wasser (90:50:20)		
Detektion: α -Naphthol-Schwefelsäure (Reagens-Nr. 163 ⁴⁵)		

Tab. 22: Identifizierung der Zuckerkomponente von SM-5 nach Hydrolyse

3.10.2. Untersuchung des Trisaccharid-Anteils von SM-5

Die bisherigen Untersuchungsergebnisse lassen darauf schließen, daß SM-5 mit dem seinerzeit von BRIGGS¹⁰⁾ beschriebenen Solasonin identisch ist. Die Daten der beiden Glykoside sind auf Seite 82 aufgeführt.

In Ergänzung zu der bisherigen Beweisführung zur Konstitution des Solasonins haben wir zusätzlich eine genaue Interpretation der ¹H-NMR-Spektren durchgeführt.

Die NMR-Spektren (Abb. 37, Abb. 38) zeigen im Bereich 2.5 - 0.5 ppm(δ) nicht nur die für ein Steroidgrundgerüst typischen sich überlagernden Resonanzen, sondern zusätzlich bei 1.73 ppm(δ) das von der 6-CH₃-Gruppe der L-Rhamnose stammende Dublett mit J = 6 Hz. Das Dublett bei 5.78 ppm(δ) mit J = 1.5 Hz stammt daher von dem C-1-Proton dieser L-Rhamnose.

Vergleicht man aber diesen für ein Steroidgrundgerüst typischen Bereich in den NMR-Spektren von SM-4 und SM-5, so fällt auf, daß die chemischen Verschiebungen der Singuletts für die 18-CH₃-Gruppe und die 19-CH₃-Gruppe sich deutlich unterscheiden, obwohl beide Glykoside das gleiche Aglykon (Solasodin) aufweisen:

	Chemische Verschiebung in ppm(δ)	
	18-CH ₃	19-CH ₃
SM-4	0.89	1.06
SM-5	0.80	0.84

Tab. 23: Chemische Verschiebung der 18-C- und 19-C-Protonen bei Substanz SM-4 und SM-5

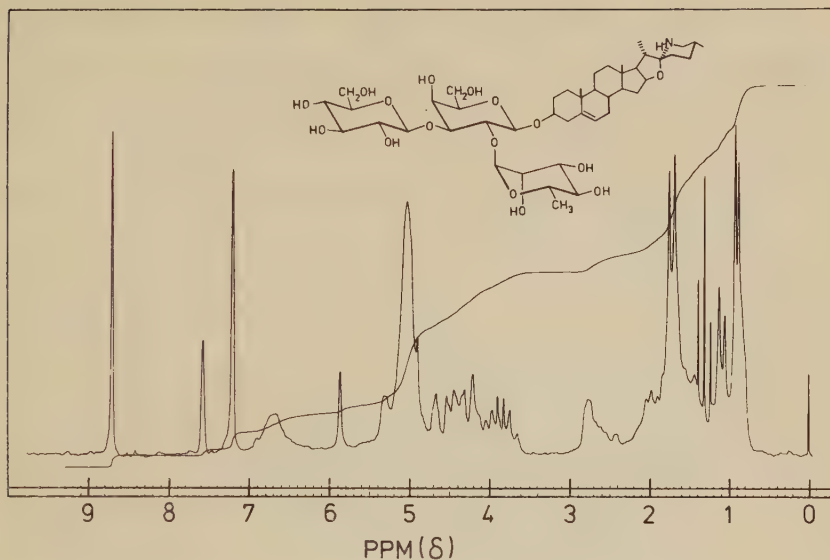


Abb. 37: ¹H-NMR-Spektrum von Substanz SM-5 (in Pyridin-d₅).

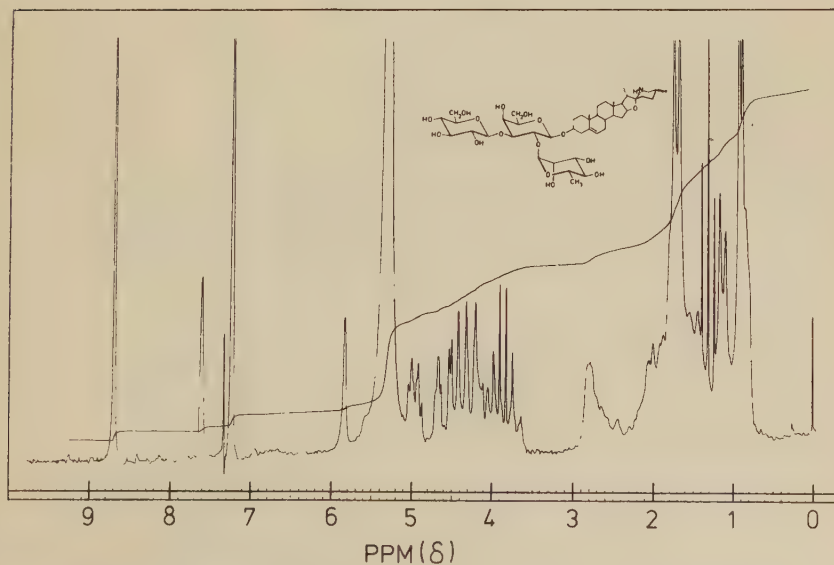


Abb. 38: ¹H-NMR-Spektrum von Substanz SM-5 (in Pyridin-d₅) nach H/D-Austausch.

Eine Erklärung für dieses Verhalten finden wir in der Arbeit von G.A. HOYER⁷⁰⁾: Die chemische Verschiebung dieser Methylgruppen wird von anderen Substituenten auch über größere Entfernung innerhalb des Moleküls beeinflusst, in diesem Fall von den jeweiligen Zuckern der Zuckerkomponente und vor allem von deren Verknüpfung untereinander.

Einen zweiten auffallenden Unterschied können wir in den NMR-Spektren von SM-4 und SM-5 bei einem Vergleich der chemischen Verschiebung des von dem Proton am C-1 der in beiden Molekülen (siehe Seite 71) β -glykosidisch gebundenen D-Glukose hervorgerufenen Dubletts beobachten:

	Chemische Verschiebung des C-1-Proton-Signals der D-Glukose in ppm(δ)	
SM-4	4.82	J = 7 Hz
SM-5	4.96	J = 7 Hz

Wir erklären sowohl die unterschiedliche chemische Verschiebung der beiden angulären Methylgruppen 18-CH₃ und 19-CH₃ als auch des C-1-Protons der D-Glukose in den NMR-Spektren von SM-4 und SM-5 durch eine veränderte Lage der D-Glukose im Molekül von SM-5: Im Gegensatz zu Substanz SM-4 ist die D-Glukose bei SM-5 nicht mit der 3-OH-Gruppe des Aglykons Solasodin verknüpft.

Das C-1-Proton der β -D-Galaktose tritt nach SIMONS und ZANGER⁴⁹⁾ als Dublett im Bereich um 5.3 ppm(δ) mit einer Kopplungskonstante J = 1.5 Hz auf. Sowohl in dem mit Pyridin-d₅ aufgenommenen als auch in dem zusätzlich mit D₂O versetzten NMR-Spektrum von SM-5 ist dieser Bereich durch eine breite Bande - hervorgerufen von H₂O-Verunreini-

gungen im Lösungsmittel - überdeckt. Es ist uns daher nicht möglich, die Signale der D-Galaktose in dem ^1H -NMR-Spektrum von SM-5 zu orten.

Wie im Spektrum von SM-4 treten im Bereich 4.7 - 3.6 ppm die sich überlagernden Resonanzen der restlichen Protonen des Trisaccharids auf. Die beiden Multipletts bei etwa 5.3 ppm(δ) und 2.8 ppm(δ) werden dem Aglykon Solasodin zugeordnet (siehe auch Seite 106).

Zusammenfassend ergibt sich: Substanz SM-5 stellt ein Glykosid mit dem Aglykon Solasodin und einem aus drei, je einmolar auftretenden Zuckern (L-Rhamnose, D-Glukose, D-Galaktose) bestehenden Zuckeranteil dar:
(3 β ,22R,25R)-Spirosol-5-en-3-yl-O- α -L-Rhamnopyranosido-(1 $\rightarrow$ 2)-O- β -D-Glukopyranosido-(1 $\rightarrow$ 3)-O- β -D-Galaktopyranosyl.

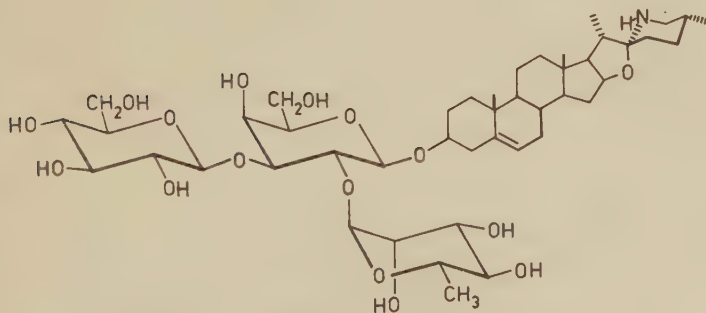


Abb. 39: Solasonin

3.10.3. Vergleich von SM-5 mit authentischem Solasonin

Wie zuvor beschrieben, sprechen alle Daten dafür, daß Substanz SM-5 wie folgt vorliegt: (3 β ,22R,25R)-Spirosol-5-en-3-yl-O- α -L-Rhamnopyranosido-(1 $\rightarrow$ 2)-O- β -D-Glucopyranosido-(1 $\rightarrow$ 3)-O- β -D-Galactopyranosyl. Ein Naturstoff dieser Konstitution ist in der Literatur unter der Bezeichnung Solasonin beschrieben.

SM-5	Solasonin	Lit.
Bruttoformel:		
C ₄₅ H ₇₃ NO ₁₆	C ₄₅ H ₇₃ NO ₁₆	
Schmelzpunkt:		
286°-288° C	301° - 302° C	10)
	266° - 268° C	73)
	286° - 289° C	71)
Optische Drehung:		
$[\alpha]_D^{20} = -82^\circ$ (Pyridin)	$[\alpha]_D^{23} = -90^\circ$ (Pyridin)	73)
$[\alpha]_D^{20} = -75^\circ$ (Methanol)	$[\alpha]_D^{23} = -88^\circ$ (Pyridin)	87)
	$[\alpha]_D^{22} = -75^\circ$ (Methanol)	88)

Tab. 24: Gegenüberstellung der Daten von SM-5 und denen von authentischem Solasonin.

3.11. Identifizierung der Substanz SM-6

3.11.1. Voruntersuchungen, Hydrolyse und spektroskopische Untersuchungen

Substanz SM-6 kristallisiert aus Methanol in feinen Nadeln mit einem Schmelzbereich von $275^{\circ} - 278^{\circ} \text{ C}$, wobei ab 251° C eine Zersetzung der Probe auftritt.

Die Substanz ist optisch aktiv:

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -87^{\circ} \text{ (Methanol, } c = 1.31 \text{)}$$

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -81^{\circ} \text{ (DMF, } c = 0.92 \text{)}$$

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -90^{\circ} \text{ (Pyridin, } c = 1.14 \text{)}$$

Die Summenformel stimmt auf

$\text{C}_{51}\text{H}_{83}\text{NO}_{21}$ (1046.23)	Ber.:	C 58.55%	H 8.00%	N 1.40%
	Gef.:	C 58.15%	H 8.05%	N 1.44%

Substanz SM-6 zeigt gegenüber den Substanzen SM-4 ($R_f = 0.44$) und SM-5 ($R_f = 0.31$) ein ausgeprägt stärker polares Verhalten: So liegt bei der DC-Untersuchung der R_f -Wert im Fließmittelgemisch $\text{CHCl}_3 : \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} : \text{NH}_3(1\% \text{ig})$ (20:20:10, untere Phase) bei $R_f = 0.15$. Auch Substanz SM-6 reagiert positiv auf die Reagentien Chlorsulfonsäure (Reagens-Nr. 49⁴⁵) und Dragendorff (Reagens-Nr. 89⁴⁵).

Auch die IR-Spektren der drei Substanzen stimmen weitgehend überein, insbesondere in den typischen Bereichen der OH-Gruppen mehrerer Zucker (sehr breite OH-Banden bei 3400 cm^{-1} und ausgeprägte C-O-Valenzschwingungen bei etwa 1100 cm^{-1}) und in dem Bereich des Steroidgrundgerüsts (2940 cm^{-1} , 2900 cm^{-1} , 2850 cm^{-1} , 1455 cm^{-1} , 1380 cm^{-1}).

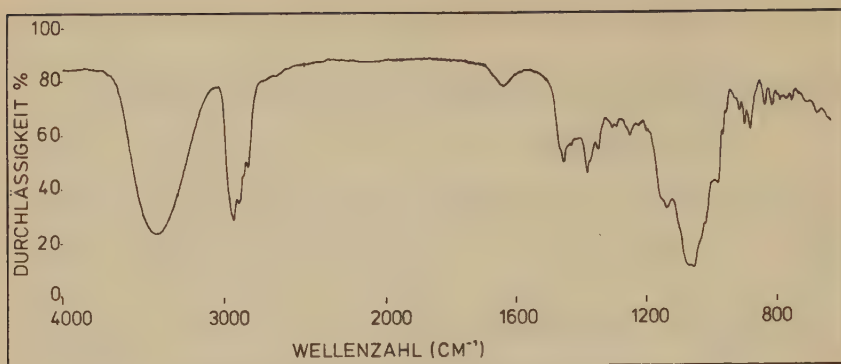


Abb. 40: IR-Spektrum von Substanz SM-6

Auch das einfache Massenspektrum von SM-6 (Abb. 41) ähnelt denen von SM-4 und SM-5. Auch hier liegen die Fragmente mit den größten Intensitäten bei m/e 138 und m/e 114. Sodann ist übereinstimmend kein Molpeak des Moleküls sondern nur der des Aglykons bei m/e 413 zu beobachten. (Über das Aglykon von SM-6, Solasodin, siehe Seite 99). Erst nach Heranziehen eines Feld-Desorptions-Spektrums kann ein Peak bei einer Massenzahl



Abb. 41: Massenspektrum von Substanz SM-6.

von m/e 1046 beobachtet werden, die dem erwarteten Molekulargewicht entspricht (siehe auch Seite 86).

Wie schon bei den Glykosiden SM-4 und SM-5 hydrolysieren wir Substanz SM-6 und untersuchen die hydrolytischen Spaltprodukte dünnschichtchromatographisch nach COUNE und DENOEL⁶⁶⁾. Das Ergebnis der DC-Überprüfung des Aglykons ist auf Seite 98 und das der Zuckerbestandteile in Tab. 25 aufgeführt.

	Rf-Wert	Farbe
Hydrolyseprodukt aus SM-6	0.78	violett
	0.33	blau
	0.26	graublau
Cochromatographie		
L-Rhamnose	0.78	violett
D-Xylose	0.56	graublau
D-Glukose	0.33	blau
D-Galaktose	0.26	graublau
Fließmittel: n-Butanol : Pyridin : Wasser (90:50:20)		
Detektion: α -Naphthol-Schwefelsäure (Reagens-Nr. 163 ⁴⁵⁾)		

Tab. 25: Identifizierung der Zuckerkomponente nach Hydrolyse der Substanz SM-6

3.11.2. Untersuchung des Tetrasaccharid-Anteils von SM-6

Bei der qualitativen Analyse des Zuckeranteils von Substanz SM-6 mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie läßt sich das Vorliegen von jenen drei Arten von Zuckern nachweisen, die auch in dem Zuckeranteil der Substanz SM-5 enthalten sind: L-Rhamnose, D-Glukose und D-Galaktose (siehe Tab. 22 und Tab. 25).

Da beide Substanzen, SM-6 und SM-5, qualitativ hinsichtlich der Zucker und des Aglykons identisch sind, läßt sich das chromatographische Inkrement nur durch Unterschiede im quantitativen Verhältnis der Zucker erklären. Die nachstehend aufgeführten Beobachtungen legen den Schluß nahe, daß es sich bei SM-6 um ein Tetrasaccharid handelt, daß also einer der drei Zucker im doppelt-molekularen Verhältnis im Glykosid vorliegt:

- (1) Substanz SM-6 weist gegenüber SM-5 ein deutlich polareres Verhalten bei der DC auf. Da beide Substanzen das gleiche Aglykon beinhalten, kann dies z.B. durch einen zusätzlichen vierten Zucker im Molekül von SM-6 erklärt werden.
- (2) Dem Ergebnis der C-H-N-Analyse kann entnommen werden, daß der Anteil von Kohlenstoff und Stickstoff bei Substanz SM-6 sich im Verhältnis zu SM-5 verringert und der Anteil von Sauerstoff sich vermehrt hat.
- (3) Während die Differenz 'Molpeak des Glykosids minus Molpeak des Aglykons' bei Substanz SM-5 den Wert 471 aufweist (siehe Seite 77), beträgt im Falle von Substanz SM-6 dieser Wert 633 ($1046 - 413 = 633$).

Es bleibt nunmehr zu klären, welcher der drei qualitativ nachgewiesenen Zucker zweimolar im Molekül SM-6 vorhanden ist. Dafür bieten sich mehrere Methoden an. In unserem Falle werden (a) die genaue Interpretation der Protonensignale im ^1H -NMR-Spektrum und (b) die quantitative Auswertung der Dünnschichtchromatogramme mit Hilfe eines Chromatogramm-Spektrophotometers^{90,91)} herangezogen.

Ad (a): Hinweise ergeben sich einmal aus doppelt auftretenden Signalen bestimmter Protonen oder aus deutlichen Unterschieden

in der Integration bestimmter Protonensignale⁸⁷⁾.

Im NMR-Spektrum von Substanz SM-6 (Abb. 42, Abb. 43) beobachten wir im Bereich 2.5 - 0.5 ppm(δ) den breiten Komplex von sich überlagernden Resonanzen der Methyl- und Methylengruppen des Steroidgrundgerüsts mit den ausgeprägten Resonanzen der angulären Methylgruppen 18-CH₃ (0.88 ppm(δ)) und 19-CH₃ (1.08 ppm(δ)). Daneben fällt in diesem Bereich das von der 6-Methylgruppe der L-Rhamnose stammende Dublett bei 1.70 ppm(δ) mit J = 6 Hz auf (Tab. 26).

	Chemische Verschiebung in ppm(δ)		
	18-CH ₃	19-CH ₃	Rhamnose-CH ₃
L-Rhamnose	-	-	1.62(d) J = 6 Hz
SM-4	0.89(s)	1.06(s)	1.77(d) J = 6 Hz 1.64(d) J = 7 Hz
SM-5	0.80(s)	0.84(s)	1.73(d) J = 6 Hz
SM-6	0.88(s)	1.08(s)	1.70(d) J = 6 Hz

Tab. 26: Chemische Verschiebung der ¹H-NMR-Signale im Bereich 2.5 - 0.5 ppm(δ) (Lösungsmittel: Pyridin-d₅)

Im vorliegenden Zusammenhang interessieren die der L-Rhamnose-Methylgruppe zuzuordnenden Signale: Im ¹H-NMR-Spektrum des di-rhamnosidischen SM-4 finden wir zwei Dubletts, nämlich bei 1.77 ppm(δ) mit J = 6 Hz und bei 1.64 ppm(δ) mit J = 7 Hz. Im Falle des fraglichen Glykosids SM-6 tritt dieses Dublett der Methylgruppe nur einmal bei 1.70 ppm(δ) mit J = 6 Hz auf, woraus sich ergibt, daß L-Rhamnose im tetraosidischen SM-6 nur einmolar vorliegen kann. Es verbleiben für Substanz SM-6 die Alternativen: 2 Mol D-Glukose oder 2 Mol D-Galaktose.

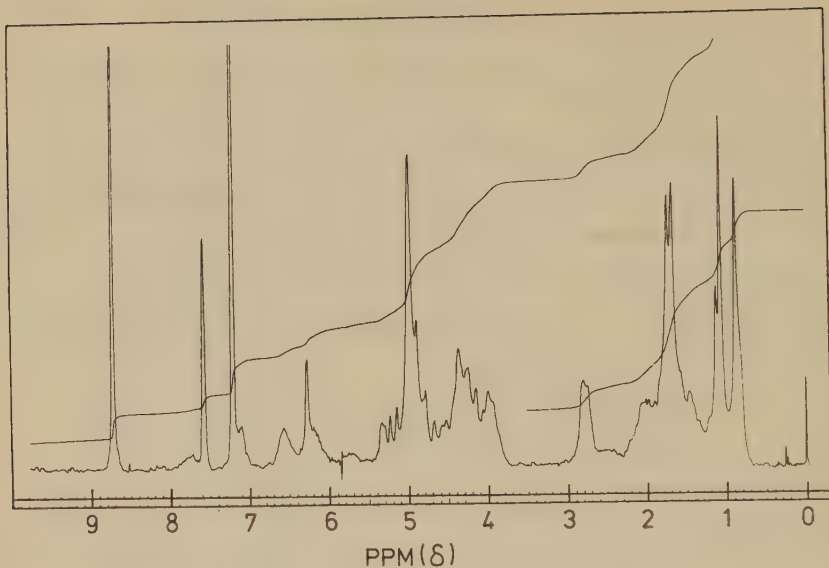


Abb. 42: ^1H -NMR-Spektrum von Substanz SM-6 (in Pyridin-d_5).

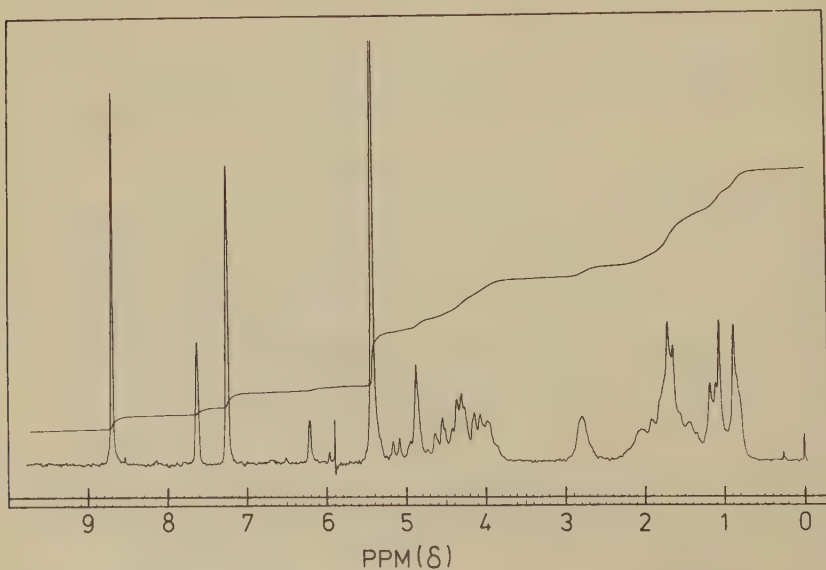


Abb. 43: ^1H -NMR-Spektrum von Substanz SM-6 (in Pyridin-d_5) nach H/D -Austausch.

Ad (b): Nach R. TSCHESCHE und G. WULFF⁸⁷⁾ bieten sich zur quantitativen Bestimmung der Zucker bevorzugt papier- und dünnschichtchromatographische Methoden sowie die Gaschromatographie der persilylierten Zucker an. Im vorliegenden Falle wird zur quantitativen Analyse des Tetraosids in SM-6 folgendes Verfahren gewählt: Quantitative Säurehydrolyse des Glykosids, Dünnschichtchromatographie der Hydrolyselösung nach COUNE und DENOEL⁶⁶⁾, Entwicklung der DC-Platte mit Thymol-Schwefelsäure (Reagens-Nr. 237⁴⁵⁾) und spektraldensitometrische Auswertung nach J. TOUCHSTONE⁹¹⁾. Auf die quantitative Bestimmung der L-Rhamnose wird dabei verzichtet, da sie wie bereits unter (a) bewiesen, einmolar im Molekül SM-6 vorkommt.

Die von dem Detektor des Spektrophotometers^{89,90)} aufzeichneten Kurven werden auf deren jeweilige Flächengröße hin untersucht. Dies geschieht sowohl durch Berechnung in mm^2 als auch durch Auswiegen der Papierflächen unter der Kurve (Tab. 27). Um in der Analyse die den jeweiligen Kurven entsprechende Menge Zucker (in mg) zu berechnen, wird die Größe der Kurve (ausgedrückt in mm^2 oder mg) in der Analyse zu der des Vergleichszuckers (D-Glukose bzw. D-Galaktose) bei gleicher Auftragsmenge ins Verhältnis gesetzt:

$$x = 10 \frac{\text{Remission}_{\text{Analyse}}}{\text{Remission}_{\text{Vergleich}}}$$

Von den in Tabelle 27 für D-Glukose bzw. D-Galaktose sich ergebenden Werten wird der Mittelwert gebildet.

Die Ergebnisse der Messung mit dem Spektraldensitometer sind in Tab. 27 zusammengefaßt. Es ergibt sich eindeutig, daß D-Glukose (Mittelwert der Messungen: 16.6 mg) und D-Galaktose (Mittelwert der Messungen: 8.1 mg)

Auftrags- menge [in μg]	Tisch- geschw. [mm/min]	Remission* Vergleichslösung/Analyse D-Glukose ber. D-Galaktose ber.	Remission* Vergleichslösung/Analyse D-Glukose ber. D-Galaktose ber.
10	300	94/161 17.2 45/ 36 8.0	7.04/12.22 17.3 3.39/ 2.67 7.9
15	300	114/181 15.9 111/ 91 8.2	7.66/12.41 16.2 7.60/ 6.23 8.2
15	60	452/765 16.9 434/361 8.3	36.77/62.14 16.9 34.82/29.25 8.4
20	300	152/243 16.0 67/ 52 7.8	11.89/19.02 16.0 4.37/ 3.50 8.0
Wellenlänge: 600 nm			
Spaltbreite: 0.07 mm			
Schreibergeschwindigkeit: 120 mm/min			
* = Relative Einheiten, Integration gemessen in mm^2			
** = Relative Einheiten, Integration gemessen in mg			

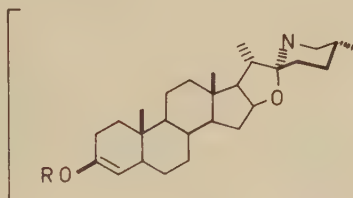
Tab. 27: Flächengröße (in mm^2 bzw. mg) unter den Kurven von D-Glukose und D-Galaktose in der Hydrolyselösung (Hydrolysat aus 52 mg Glykosid/ 10 ml) von SM-6 und in Vergleichslösungen (10 mg Zucker/10 ml) mit anschließender Berechnung des Zuckergehaltes (in mg) in der Hydrolyselösung.

in Molekül SM-6 im Verhältnis 2 : 1 vorliegen.

Für Substanz SM-6 können wir daher folgende Aussage treffen:
Das Tetraosid SM-6 mit Solasodin als Aglykon enthält in dem Zuckeranteil 2 Moleküle D-Glukose und je 1 Mol D-Galaktose und 1 Mol L-Rhamnose.

R= TETRAOSID AUS

2 MOL D-GLUKOSE
1 MOL D-GALAKTOSE
1 MOL L-RHAMNOSE



3.11.3. Zur Konstitution des Tetraosids

Es stellt sich nunmehr die Frage, wie die vier Zuckermoleküle miteinander verknüpft und an dem Aglykon gebunden sind. Die klassische Methode zur Ermittlung der Zuckerverknüpfung in einem Glykosid ist die Permethylierung, die anschließende saure Spaltung und die Identifizierung der gebildeten, ganz oder teilweise methylierten Monosaccharide⁸⁷⁾. Diese Methode setzt das Vorhandensein zahlreicher Vergleichssubstanzen voraus*.

Im vorliegenden Falle wird lediglich versucht, mit Hilfe der NMR-Methode diese Frage anzugehen. Die NMR-Methode beruht auf der Auswertung von chemischer Verschiebung und Kopplungs-

* Entsprechende Vergleichssubstanzen waren mir leider nicht zugänglich.

konstante des anomeren Protons am C-1, wobei die Kopplungskonstante speziell anzeigt, ob eine α - oder β -glykosidische Bindung vorliegt (siehe beispielsweise Tab. 28, die zugleich Auskunft über Lösungsmittelleffekte beim Übergang von D_2O zu Pyridin- d_5 gibt).

Zucker	Chemische Verschiebung der Protonen an C-1 in ppm(δ)	
	SIMONS und ZANGER ⁴⁹⁾ (in D_2O aufgenommen)	Eigene Werte (in Pyridin- d_5)
α -L-Rhamnose	5.10 J = 2 Hz	5.86 J = 2 Hz
β -L-Rhamnose	4.81 J = 2 Hz	5.15 J = 2 Hz
α -D-Galaktose	5.30 J = 1.7 Hz	5.80 J = 1.5 Hz
β -D-Galaktose	4.60 J = 6.8 Hz	5.12 J = 8 Hz
α -D-Glukose	5.20 J = 3.1 Hz	5.80 J = 4 Hz
β -D-Glukose	4.60 J = 7.2 Hz	5.08 J = 8 Hz

Tab. 28: Chemische Verschiebung und Kopplungskonstante der Protonen an C-1 einiger Zucker (in D_2O und in Pyridin- d_5 aufgenommen).

Der für die Protonensignale von Zuckern charakteristische Bereich in den 1H -NMR-Spektren liegt etwa zwischen 6.5 ppm(δ) und 3.5 ppm(δ)⁹²⁾, wobei das Proton am acetalischen C-1 des jeweiligen Zuckers stets bei höchstem Feld erscheint. Die Konfiguration an der glykosidischen Bindung ergibt sich aus den unterschiedlichen Kopplungskonstanten für das Signal des Protons am C-1 bei manchen Zuckern [z.B. bei α -glucosidischer Bindung (3 Hz) und β -glucosidischer Bindung (6-7 Hz)]⁸⁷⁾.

Sofern hinreichendes glykosidisches Vergleichsmaterial zur Verfügung steht, kann zusätzlich nach dem Vorbild von G.A. HOYER⁷⁰⁾ eine Art Superpositionsmethode der 1H -NMR-Spektren herangezogen werden.

Sie beruht nach HOYER⁷⁰⁾ darauf, daß die chemische Verschiebung der anomeren Protonen in Stereoidglykosiden stark von der Verknüpfungsstelle der Zucker untereinander und weniger von dem Stereoidaglykon abhängt.

HOYER beschreibt vier Diosgenin-Glykoside:

- (A) Diosgenin-3-O- α -L-Rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-Glucopyranosyl,
- (B) Diosgenin-3-O- α -L-Rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Glucopyranosyl,
- (C) Diosgenin-3-O- α -L-Rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- α -L-Rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Glucopyranosyl,
- (D) Diosgenin-3-O- α -L-Rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- α -L-Rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- α -L-Rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Glucopyranosyl.

In Tabelle 29 sind die chemischen Verschiebungen der Protonen am C-1 der jeweiligen Zucker dieser vier Diosgenin-Glykoside und die von Substanz SM-6 widergegeben:

	Glykosid				SM-6
	A	B	C	D	
H-1'	4.98d	4.95m	4.87m	4.87m	4.87d verbreitet
H-1''		6.28m	6.27m	6.27m	6.22d verbreitet
H-1'''	5.78m		5.74m	5.71m	
H-1''''				6.15m	
H-1' = Glukose in C-3-Stellung des Aglykons					
H-1'' = Rhamnose in C-2-Stellung der Glukose (H-1')					
H-1''' = Rhamnose in C-4-Stellung der Glukose (H-1')					
H-1'''' = Rhamnose in C-4-Stellung der Rhamnose (H-1''')					

Tab. 29: Chemische Verschiebung der Protonen an C-1 von D-Glukose und L-Rhamnose verschiedener Glykoside
Lösungsmittel: Pyridin-d₅.

Die relevanten Ergebnisse der Tabelle 29 sind noch einmal in Abb. 44 übersichtlich veranschaulicht.

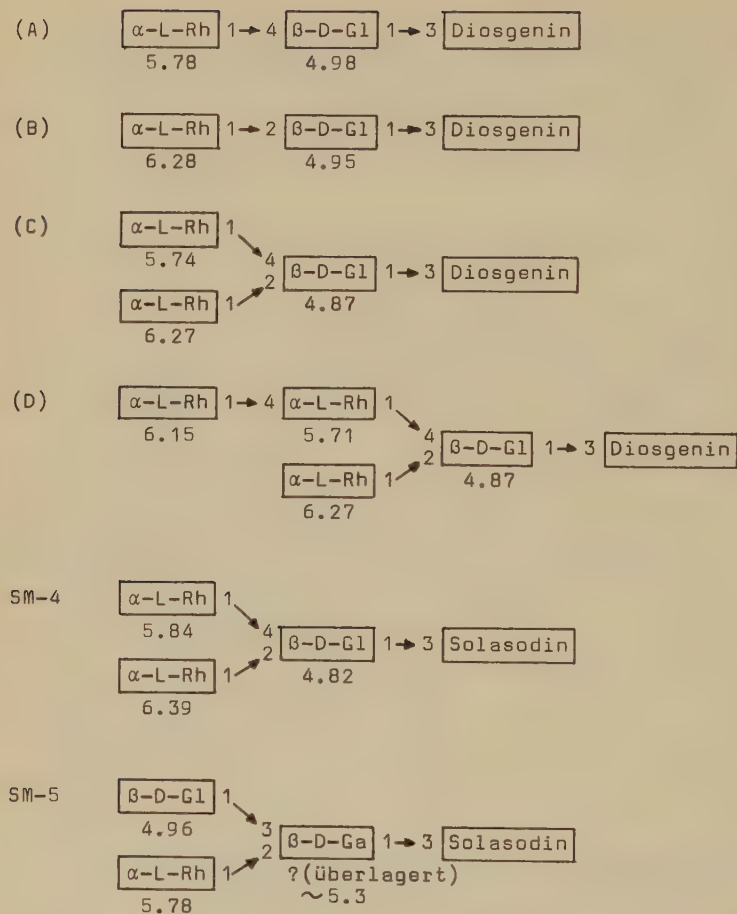


Abb. 44: Chemische Verschiebung (in ppm(δ)) der anomeren Protonen der Diosgenin-Glykoside A bis D nach HOYER⁷⁰⁾ im Vergleich mit denen der Glykoside SM-4 und SM-5. Lösungsmittel: Pyridin-d₅

Man erkennt sowohl in Tab. 29 als auch in Abb. 44, daß beispielsweise im Glykosid C die chemische Verschiebung des Protons am C-1 von L-Rhamnose, welches an die 2-OH-Gruppe der D-Glukose gebunden ist, den Wert 6.27 ppm(δ) aufweist, während das Proton am C-1 von L-Rhamnose nach Verknüpfung mit der 4-OH-Gruppe der D-Glukose nach höherem Feld, 5.74 ppm(δ), verschoben ist.

In dem Bereich zwischen 6.5 ppm(δ) bis 4.5 ppm(δ) finden wir in den ^1H -NMR-Spektren von SM-6 (Abb. 42, Abb. 43) drei Signale, von denen eines (5 Einheiten) im Vergleich zu den beiden anderen (je 2.5 Einheiten) doppelt integriert, und zwar das Dublett bei 4.87 ppm(δ) mit $J = 8 \text{ Hz}$:

6.22 ppm(δ)	d	$J = 1.5 \text{ Hz}$	Integration: 2.5 Einheiten
5.14 ppm(δ)	d	$J = 7 \text{ Hz}$	Integration: 2.5 Einheiten
4.87 ppm(δ)	d	$J = 8 \text{ Hz}$	Integration: 5 Einheiten

Wie sind nun die ^1H -NMR-Signale der Protonen am C-1 der vier Zucker von SM-6 zu interpretieren? Nach dem Prinzip der Superposition (Tab. 29) wird man das Signal bei 4.87 ppm(δ) mit der Kopplungskonstante $J = 8 \text{ Hz}$ einer D-Glukose zuordnen, die direkt β -glykosidisch mit dem Aglykon (Solasodin) verknüpft ist. Das Dublett bei $\delta = 6.22 \text{ ppm}$ mit $J = 1.5 \text{ Hz}$ wird von dem Proton am C-1 der L-Rhamnose hervorgerufen, welche α -glykosidisch an der 2-OH-Gruppe jener D-Glukose gebunden ist.

Um nun die Konfiguration der beiden noch nicht zugeordneten Zucker, D-Glukose und D-Galaktose, festzulegen, müßte entsprechendes Vergleichsmaterial herangezogen werden, das leider nicht zur Verfügung steht. Aus den Kopplungskonstanten

der beiden noch verbleibenden Dubletts bei $\delta = 5.14$ mit $J = 7$ Hz und $\delta = 4.87$ ppm mit $J = 8$ Hz kann lediglich noch geschlossen werden, daß D-Galaktose und D-Glukose β -glykosidisch vorliegen müssen.

Werfen wir noch einen Blick auf Tabelle 30:

	Chemische Verschiebung in ppm(δ)	
	18-CH ₃	19-CH ₃
SM-6	0.88	1.08
SM-4	0.89	1.06
SM-5	0.80	0.84

Tab. 30: Chemische Verschiebung der 18-CH₃ und 19-CH₃-Gruppen von SM-6, SM-4 und SM-5

Sie liefert einen unabhängigen Beweis dafür, daß die Teilstruktur Solasodin-3-O- α -L-Rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Glucopyranosyl vorliegt. Die mit dem Aglykon verknüpften Komponenten haben überraschenderweise Einfluß auf die chemische Verschiebung der 18-CH₃ und 19-CH₃-Gruppe des Steroids⁷⁰⁾. Man erkennt aus Tabelle 30, daß bezüglich der Lage dieser beiden Methyle die beiden Glykoside SM-4 und SM-6 übereinstimmen, demnach identische Teilstrukturen - und zwar Solasodin-3-O- α -L-Rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Glucopyranosyl - aufweisen dürften. Erwartungsgemäß weichen die Werte von Glykosid SM-5 ab.

Die Ergebnisse der Konstitutionsuntersuchung der Substanz SM-6 lassen sich in folgendem Formelbild (Abb. 45) wiedergeben:

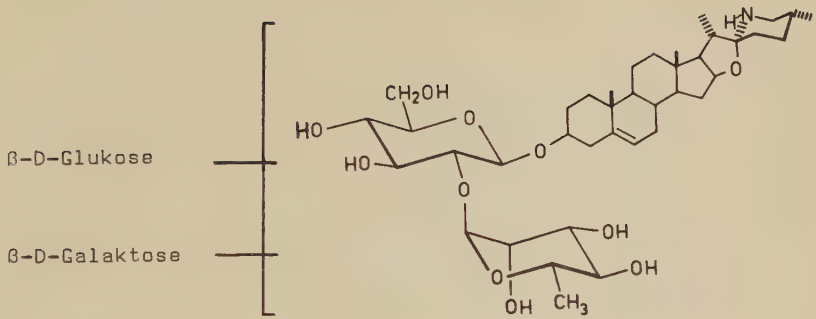


Abb. 45: Teilstruktur der Substanz SM-6.

3.12. Trennung und Isolierung der aglykonischen Hydrolyseprodukte von SM-4, SM-5 und SM-6

Bei der DC-Überprüfung der Hydrolyselösung der Substanzen SM-4, SM-5 und SM-6 zeigt sich, daß nicht - wie erwartet - ein einziges Aglykon, sondern zusätzlich eine zweite Substanz auftritt. Diese Beobachtung läßt zwei Interpretationen zu: Einmal kann es sich um ein noch unbekanntes Glykosid mit einem Aglykon handeln, das nicht Solasodin darstellt, sodann aber mußte auch mit der Möglichkeit einer Artefaktbildung gerechnet werden, zumal diese zweite Substanz bei allen drei Hydrolyseprodukten auftritt. Dies veranlaßt uns, die beiden Hydrolyseprodukte zu trennen und in reiner, kristalliner Form zu isolieren. Wie im Versuchsteil näher beschrieben, werden 6 g Glykosidgemisch hydrolysiert und nach anschließendem Ausfällen der Alkaloide durch Alkalisieren wird das Praecipitat mit Hilfe einer Kieselgelsäule und dem Fließmittel Chloroform : Methanol (95:5) aufgetrennt:

Rf-Wert	Dragendorff-Reagens	Chlorsulfonsäure-Reag.	isolierte Menge	Ausbeute (Hydrolyse)
0.50	positiv	braun(Tgl.)	579 mg	41 %
0.38	positiv	braun(Tgl.)	813 mg	59 %
Fließmittel: Chloroform : Aceton (90:10)				

Tab. 31: DC-Überprüfung der aglykonischen Hydrolyseprodukte

3.13. Identifizierung des Hydrolyseproduktes $R_f = 0.38$

(= Solasodin)

3.13.1. Voruntersuchungen und spektroskopische Untersuchungen

Das Hydrolyseprodukt $R_f = 0.38$ kristallisiert aus 90%igem Methanol in Nadeln mit einem Schmelzpunkt von $201^{\circ} - 203^{\circ} \text{ C}$. Die Substanz ist optisch aktiv:

$$[\alpha]_D^{23} = -92^{\circ} \text{ (Methanol, } c = 1.08)$$

Die Summenformel stimmt auf

$\text{C}_{27}\text{H}_{43}\text{O}_2\text{N}$ (413.52)	Ber.: C 78.40%	H 10.48%	N 3.39%
$\text{C}_{27}\text{H}_{43}\text{O}_2\text{N} \times \text{H}_2\text{O}$	Ber.: C 76.72%	H 10.49%	N 3.31%
	Gef.: C 76.48%	H 10.22%	N 3.12%

Das Hydrolyseprodukt $R_f = 0.38$ reagiert sowohl auf die Reaktion nach LIEBERMANN-BURCHARD wie nach DC-Untersuchung mit dem Chlorsulfonsäure-Reagens als auch mit dem Dragendorff-Reagens positiv, so daß wir einen Naturstoff vom Typus der Steroidalkaloide vermuten können.

Im ultravioletten Bereich zeigt sich bei dem Hydrolyseprodukt $R_f = 0.38$ keine Absorption. Chromophore Systeme lassen sich daher ausschließen.

Dem IR-Spektrum (Abb. 46) können wir entnehmen:

- (1) die schon bei den Glykosiden SM-4, SM-5 und SM-6 beobachteten charakteristischen Steroidbanden bei 2950 cm^{-1} , 1455 cm^{-1} und 1380 cm^{-1} ,
- (2) eine breite Bande bei 3400 cm^{-1} (OH-Valenzschwingung), die auf eine freie OH-Gruppe hindeutet.

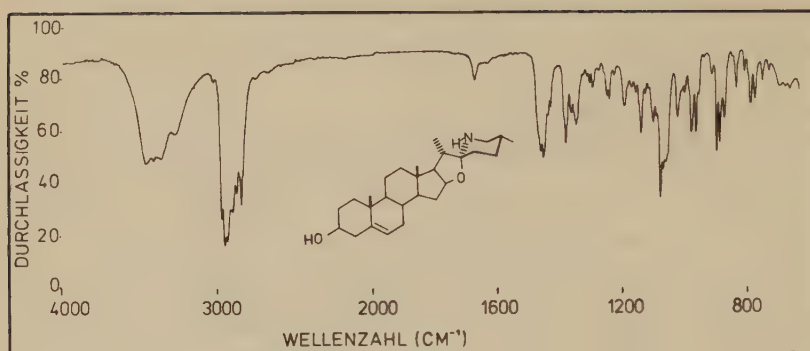


Abb. 46: IR-Spektrum des Hydrolyseproduktes $R_f = 0.38$

Das Massenspektrum (Abb. 47) zeigt einen Molekülpeak bei m/e 413, welcher im Einklang mit dem Ergebnis der Elementaranalyse steht und den Gehalt eines N-Atoms im Molekül bestätigt. Das Signal m/e 395 (M-18) entsteht durch H_2O -Abspaltung und deutet auf eine freie OH-Gruppe im Molekül hin. Die intensivsten Peaks des Spektrums stellen die Fragmente m/e 138 und m/e 114 (Basispeak) dar. Nach BUDZIKIEWICZ und

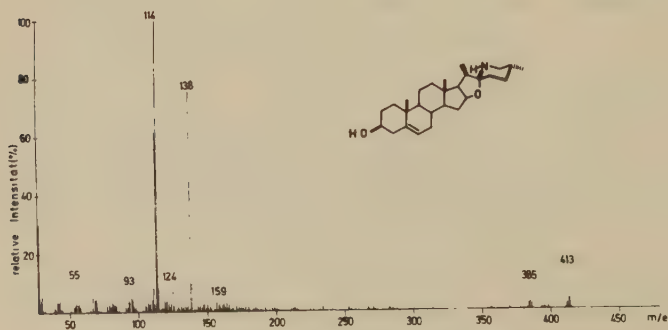


Abb. 47: Massenspektrum des Hydrolyseproduktes $R_f = 0.38$

DJERASSI⁷⁴⁾ kann das Ion m/e 138 als charakteristisch für Steroidalkaloide mit einem intakten Spiroketalssystem angesehen werden, womit belegt ist, daß der Ring F im Molekül dieses Hydrolyseproduktes nicht in offener Form vorliegt. Der massenspektroskopische Abbau des Hydrolyseproduktes $R_f = 0.38$ zu dem Fragment m/e 138 ist in Abbildung 48 aufgezeichnet.

In der gleichen Arbeit⁷⁴⁾ wird ferner von der Bildung des Ions m/e 114 berichtet, welches bei dem Hydrolyseprodukt

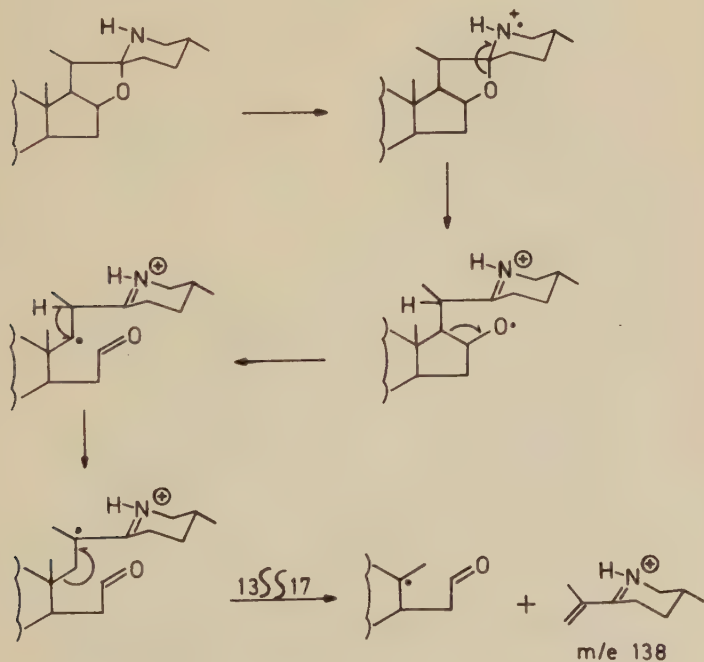


Abb. 48: Massenspektroskopischer Abbau zu dem Fragment m/e 138

als Basispeak auftritt. Wie schon das Fragment m/e 138 entsteht auch das Spaltprodukt m/e 114 aus dem Ring F, so daß es als weiteres Charakteristikum von Spiro-Steroidalkaloiden betrachtet werden kann. Abb. 49 zeigt den Zerfall des Moleküls zu dem Fragment m/e 114.

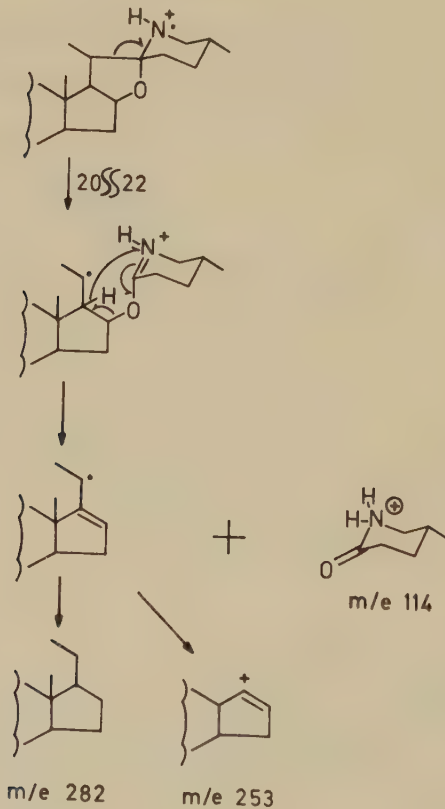


Abb. 49: Massenspektroskopischer Abbau zu dem Fragment m/e 114

Einer Mitteilung von FAUL und DJERASSI⁷⁵⁾ können wir den massenspektroskopischen Zerfall von Spirosolanen zu dem Fragment m/e 125 entnehmen, dessen Peak wir ebenfalls im Massenspektrum des Hydrolyseproduktes beobachten. Auch dieses Fragment wird von dem Ring F der Spiro-Steroidalkaloide gebildet. Ein Schema des Zerfalls bis zu diesem Spaltprodukt ist in Abbildung 50 dargestellt.

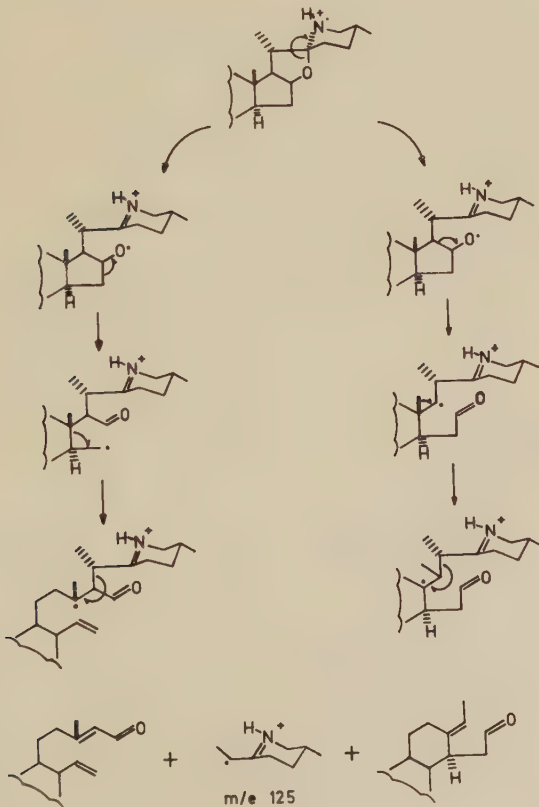


Abb. 50: Massenspektroskopischer Abbau zu dem Fragment m/e 125

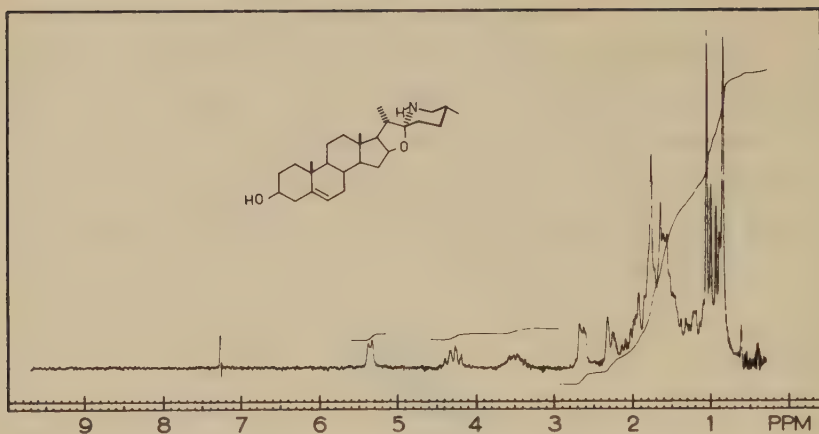


Abb. 51: ^1H -NMR-Spektrum des Hydrolyseproduktes $R_f = 0.38$

Das NMR-Spektrum (Abb. 51) des Hydrolyseproduktes $R_f = 0.38$ ist im Bereich der tiefen Frequenzen 2.0 – 0.5 ppm(δ) ähnlichen der zuvor beschriebenen Substanzen. Der breite Komplex von sich überlagernden Resonanzen in diesem Abschnitt des Spektrums ist typisch für das Verhalten von Methylengruppen und den herausragenden angularen Methylgruppen 18- CH_3 (0.82) und 19- CH_3 (1.02 ppm(δ)).

Aus dem Massenspektrum können wir schließen, daß es sich bei dem Hydrolyseprodukt $R_f = 0.38$ um ein Spiroaminoketal-Alkaloid handelt. Diese für bestimmte Solanum-Arten charakteristischen Inhaltsstoffe unterscheiden sich mitunter nur in ihrer Konfiguration, d.h. es gibt verschiedene stereoisomere Formen eines Moleküls. Mit der Lösung dieser Problematik befaßt sich eine Arbeit von M. BOLL⁷⁶). Dieser untersuchte vor allem den Bereich 1.1 – 0.7 ppm(δ) der verschiedensten Spiroaminoketal-Alkaloide und deutete ferner

die weiteren mit Hilfe der ^1H -NMR-Spektroskopie erfaßbaren Substituenten des Moleküls. Nach RAJARAMAN⁷⁷⁾ erscheint sowohl das 21- CH_3 -Signal als auch das 27- CH_3 -Signal jeweils als Dublett mit $J = 6 \text{ Hz}$, wobei die 27- CH_3 -Gruppe bei höherem Feld auftritt. In unserem Spektrum des Hydrolyseproduktes $R_f = 0.38$ können wir - auf diesen Arbeiten fußend - die 21- CH_3 -Gruppe dem Dublett bei $0.94 \text{ ppm}(\delta)$ mit $J = 6 \text{ Hz}$ und die 27- CH_3 -Gruppe dem Dublett bei $0.85 \text{ ppm}(\delta)$ mit $J = 6 \text{ Hz}$ zuordnen.

Auf Grund der aus dem Massenspektrum gefolgerten Charakteristika (Molpeak m/e 413 und Fragmentierungsschemata) sind nur noch zwei Molekülvarianten möglich: die stereoisomeren Substanzen Solasodin und Δ^5 -Tomatidenol, die sich in der Konfiguration des Ringes F unterscheiden. Solasodin gehört zu der (25-R)-Serie, während Δ^5 -Tomatidenol der (25-S)-Serie angehört.

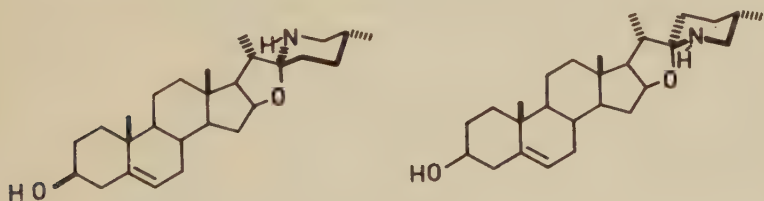


Abb. 52: Solasodin und Δ^5 -Tomatidenol

Zwar stimmen die Werte der chemischen Verschiebung (siehe Tabelle 32) des Hydrolyseproduktes $R_f = 0.38$ mit denen von Solasodin exakt überein, der Unterschied der chemischen Verschiebung dieser Methylgruppensignale zu denen von Δ^5 -Tomatidenol ist jedoch zu gering, um eine endgültige

Aussage treffen zu können.

	19-CH ₃	18-CH ₃	21-CH ₃	27-CH ₃
Δ^5 -Tomatidenol	1.03	0.84	0.97	0.85
Solasodin	1.02	0.82	0.94	0.85
Hydrolyseprodukt Rf = 0.38	1.02	0.82	0.94	0.85

Tab. 32: Chemische Verschiebung in ppm(δ) von Δ^5 -Tomatidenol und Solasodin nach BOLL und vom Hydrolyseprodukt

Mit Hilfe der Arbeit von M. BOLL⁷⁶⁾ können wir ferner die bei tieferem Feld gelegenen Signale des Hydrolyseproduktes Rf = 0.38 identifizieren: So ist das bei 5.34 ppm(δ) auftretende Multipllett dem 6-H-Proton zuzuordnen - zugleich Beweis für das Vorliegen einer Δ^5 -Doppelbindung. Das zur 3-OH-Gruppe geminal stehende Proton 3-H erscheint bei 3.50 ppm(δ), während die Multipletts bei 4.28 ppm(δ) dem 16-H-Proton mit Sauerstoff in Nachbarstellung und das Multipllett bei 2.62 ppm den 26-H-Protonen mit Stickstoff in Nachbarstellung zugewiesen werden können:

	3-H	6-H	16-H	26-H
Δ^5 -Tomatidenol	3.48	5.33	4.13	2.74
Solasodin	3.50	5.34	4.28	2.62
Hydrolyseprodukt Rf = 0.38	3.50	5.34	4.28	2.62

Tab. 33: Chemische Verschiebung in ppm(δ)[CDCl₃] des Hydrolyseproduktes in Vergleich mit Angaben der Literatur

Eine zusätzliche Klärung dieses Problems^{66,78)} geben die IR-Spektren von Δ^5 -Tomatidenol und Solasodin. Im Gegensatz

zu Δ^5 -Tomatidenol mit einer Einzelbande bei 2940 cm^{-1} weist Solasodin im Bereich 2940 cm^{-1} zwei sehr stark ausgeprägte Banden auf. Die mittelstarke Bande bei 2875 cm^{-1} fehlt im Falle Δ^5 -Tomatidenol ebenso wie eine schwache bei 2750 cm^{-1} . Dafür ist im Spektrum von Δ^5 -Tomatidenol im Bereich 1150 cm^{-1} bis 1000 cm^{-1} eine breite, starke Bande vorhanden. Dieser Bereich ist bei Solasodin durch mehrere, unterschiedlich intensive Peaks besetzt.

Abbildung 53 zeigt, daß die IR-Überlagerungsspektren von authentischem Solasodin* und dem Hydrolyseprodukt $R_f = 0.38$ deckungsgleich sind.

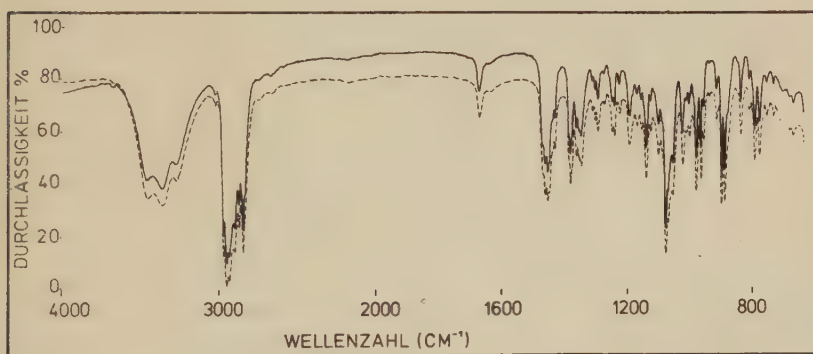


Abb. 53: IR-Überlagerungsspektrum von Solasodin mit dem Hydrolyseprodukt $R_f = 0.38$

* Handelsprodukt der Fa. Roth

Werte der optischen Drehung:

Hydrolyseprodukt Rf = 0.38	$[\alpha]_D^{23} = -92^\circ$ (Methanol)
Solasodin ¹⁴⁾	$[\alpha]_D^{20} = -97^\circ$ (Methanol)
Δ^5 -Tomatidenol ¹⁾	$[\alpha]_D^{20} = -37^\circ$ (Chloroform)

Tab. 34: Werte der optischen Drehung von Δ^5 -Tomatidenol, Hydrolyseprodukt Rf = 0.38 und Solasodin

Der Mischschmelzpunkt einer Verreibung aus dem Hydrolyseprodukt Rf = 0.38 und authentischem Solasodin ergibt keine Depression:

Schmelzpunkt Solasodin	201° - 203° C
Hydrolyseprodukt Rf = 0.38	200° - 202° C
Mischschmelzpunkt beider Substanzen	: 200° - 202° C

Tab. 35: Vergleich der Schmelzpunkte von Solasodin und dem Hydrolyseprodukt Rf = 0.38

	Rf-Werte		Dragendorff-Reagens
	I	II	
Solasodin	0.38	0.40	positiv
Hydrolyseprodukt Rf = 0.38	0.38	0.40	positiv
I = Chloroform : Aceton (90:10) II = Chloroform : Methanol (90:10)			

Tab. 36: DC-Vergleich von Solasodin und Hydrolyseprodukt

Auf Grund dieser Untersuchungen können wir das Hydrolyseprodukt Rf = 0.38 als **S o l a s o d i n** identifizieren.

3.14. Identifizierung des Hydrolyseproduktes $R_f = 0.50$
(= Solasodien)

3.14.1 Voruntersuchungen und spektroskopische Untersuchungen

Das Hydrolyseprodukt $R_f = 0.50$ kristallisiert aus 90%igem Methanol in feinen Nadeln mit einem Schmelzpunkt von $169^{\circ} - 172^{\circ}$ C. Die Substanz ist optisch aktiv:

$$[\alpha]_D^{23} = -164^{\circ} \text{ (Methanol, } c = 0.98 \text{)}$$

Die Summenformel stimmt auf

$C_{27}H_{42}NO$ (395.63)	Ber.:	C 81.97%	H 10.45%	N 3.54%
	Gef.:	C 81.42%	H 10.43%	N 3.38%

Ebenso wie das Hydrolyseprodukt $R_f = 0.38$ reagiert auch das Hydrolyseprodukt $R_f = 0.50$ nach DC-Analytik positiv auf das Chlorsulfonsäure-Reagens und das Dragendorff-Reagens.

Das IR-Spektrum des Hydrolyseproduktes $R_f = 0.50$ (Abb. 54) zeigt Ähnlichkeit mit dem des Hydrolyseproduktes $R_f = 0.38$.

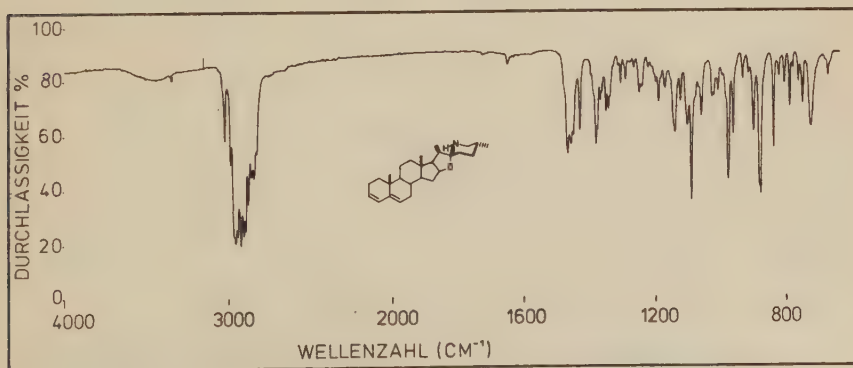


Abb. 54: IR-Spektrum des Hydrolyseproduktes $R_f = 0.50$

Auffällig ist jedoch, daß die breite OH-Bande des IR-Spektrums des Hydrolyseprodukts $R_f = 0.38$ im Bereich um etwa 3400 cm^{-1} vollständig fehlt. Dies deutet auf einen Verlust der OH-Gruppe am C-3 des Solasodins hin⁷⁹⁾.

Im Massenspektrum des Hydrolyseprodukts $R_f = 0.50$ (Abb. 55) erscheinen die intensivsten Ionen wie bei Solasodin bei m/e 114, m/e 125 und m/e 138, was bedeutet, daß die Substanzen Hydrolyseprodukt $R_f = 0.38$ und Hydrolyseprodukt $R_f = 0.50$ sich in der Anordnung der Ringe D, E und F nicht unterscheiden. Die Fragmente m/e 282, m/e 267 und m/e 253 treten im Massenspektrum des Hydrolyseprodukts $R_f = 0.50$ noch deutlicher auf als in dem des Hydrolyseprodukts $R_f = 0.38$ (siehe Abb. 49).

Einen Molpeak können wir im Massenspektrum des Hydrolyseprodukts $R_f = 0.50$ bei m/e 395 beobachten. Der relevante Unterschied zwischen dem zuvor beschriebenen Hydrolyseprodukt $R_f = 0.38$ und dem Hydrolyseprodukt $R_f = 0.50$ besteht darin, daß sich die Molpeaks in einer Massendifferenz von 18 ($413 - 395 = 18$) unterscheiden. Offensichtlich unterschei-

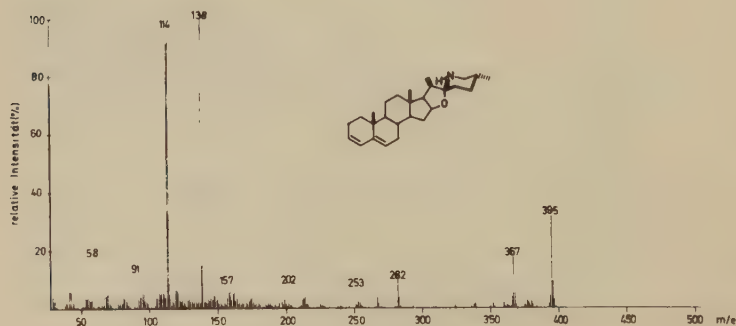


Abb. 55: Massenspektrum des Hydrolyseprodukts $R_f = 0.50$

det sich das Hydrolyseprodukt $R_f = 0.50$ vom Solasodin durch Austritt von Wasser, was in Übereinstimmung mit den IR-Spektren steht. Es liegt nahe, daß es sich um Solasodien handeln könnte, wofür auch die positive Reaktion nach ROSENHEIM⁸⁰⁾ (Hinweis auf Vorliegen eines konjugierten Doppelbindungssystems) spricht.

Mit dieser Annahme lassen sich auch die übrigen Spektren, nämlich UV- und NMR-Spektrum interpretieren:

Das UV-Spektrum des Hydrolyseprodukts $R_f = 0.50$ (Abb. 56)

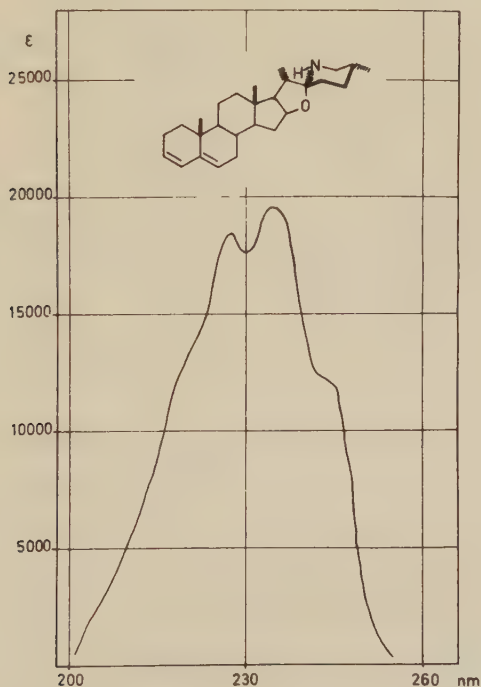


Abb. 56: UV-Spektrum des Hydrolyseprodukts $R_f = 0.50$

zeigt ein doppeltes Absorptionsmaximum bei 227 nm ($\epsilon = 18200$) und 234 nm ($\epsilon = 19400$), was nach DORFMAN⁸¹⁾ für ein Steroidgrundgerüst mit bestimmtem Doppelbindungssystem charakteristisch ist:

Konjugierte Doppelbindung	$\lambda_{\max}$ Durchschnittswerte	$\epsilon_{\max}$	$\lambda_{\max}$ berechnet
$\Delta^{2,4}$	275	6.300-20.000	273
$\Delta^{3,5}$	228	18.600	234
	235	19.000	
	243	13.600	
$\Delta^{4,6}$	232	21.500	234
	239	23.500	
	248	16.000	
$\Delta^{5,7}$	271	11.400	283
	282	11.900	
	293	6.900	
$\Delta^{6,8(9)}$	275	5.000	273

Tab. 37: UV-Maxima einiger Steroide mit konjugierten Doppelbindungssystemen

Wie Tabelle 37 zeigt, ist bei dem Hydrolyseprodukt $R_f = 0.50$ eine $\Delta^{3,5}$ -Doppelbindung zu postulieren.

Ein Vergleich des NMR-Spektrums des Hydrolyseprodukts $R_f = 0.50$ (Abb. 57) mit dem von Solasodin zeigt, daß sich die Signale der Protonen aus den Ringen B,C,D,E und F des Steroidgerüsts in deren chemischen Verschiebungen annähernd gleichen, so daß der Unterschied zwischen beiden Molekülen im Ring A liegen muß (siehe Tabelle 38).

	Chemische Verschiebung in ppm(δ) [CDCl_3]	
	Hydrolyseprodukt	
	Rf = 0.38	Rf = 0.50
18-C-Protonen	0.82	0.87
19-C-Protonen	1.03	0.97
26-C-Protonen	2.62	2.64
16-C-Proton	4.28	4.28
6-C-Proton	5.34	5.37

Tab. 38: Chemische Verschiebung in den NMR-Spektren der Hydrolyseprodukte

Ein deutlicher Unterschied tritt allein in der chemischen Verschiebung des C-3-Protons auf. Dieses Multipllett des C-3-Protons des Hydrolyseprodukts Rf = 0.50 ist stärker entschirmt ($\delta = 5.60$ ppm) als das des Hydrolyseprodukts Rf = 0.38 ($\delta = 3.50$ ppm). Dies erklärt sich durch die Bildung der konjugierten Doppelbindung $\Delta^{3,5}$. Gleichzeitig erscheint

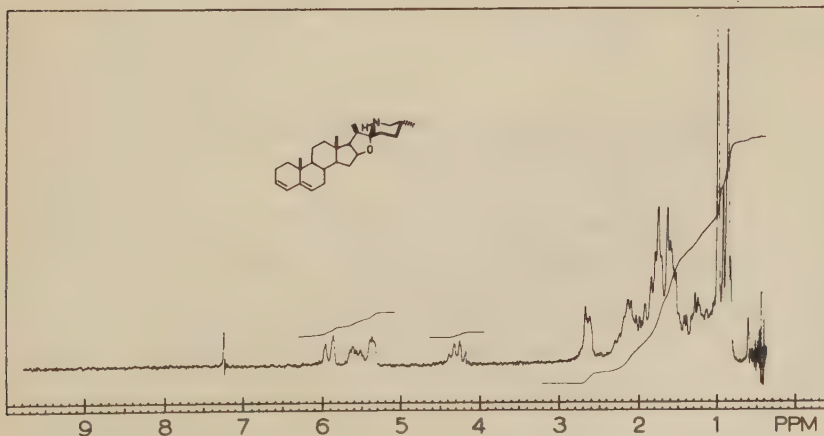


Abb. 57: ^1H -NMR-Spektrum des Hydrolyseproduktes Rf = 0.50

das C-4-Proton nach Kopplung mit dem C-3-Proton als Dublett bei $\delta = 5.92$ ppm mit $J = 10$ Hz.

Zusammenfassend ergibt sich: Das Hydrolyseprodukt $R_f = 0.50$ ist mit Hilfe spektroskopischer Methoden als $\Delta^{3,5}$ -Solasodien identifiziert worden, ein Artefakt, das während der sauren Hydrolyse durch Eliminierung von Wasser aus Solasodin entsteht.

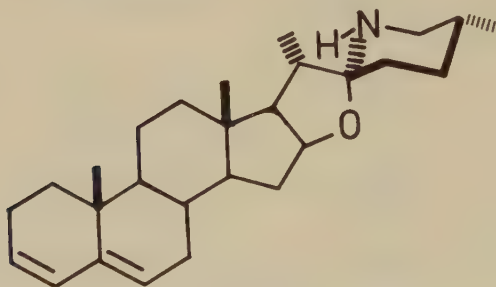


Abb. 58: $\Delta^{3,5}$ -Solasodien

3.14.2. Vergleich des Hydrolyseprodukts $R_f = 0.50$ mit
authentischem Solasodien

Wie vorhergehend beschrieben, sprechen alle Daten dafür, daß das Hydrolyseprodukt $R_f = 0,50$ wie folgt vorliegt: (22R,25R)-Spirosola-3,5-dien. In der Literatur ist ein Stoff mit gleicher Konstitution unter der Bezeichnung Solasodien beschrieben.

Hydrolyseprodukt Rf = 0.50	Solasodien	Lit.
Bruttoformel:		
$C_{27}H_{41}NO$	$C_{27}H_{41}NO$	
Schmelzpunkt:		
$169^{\circ} - 172^{\circ}$	$170^{\circ} C$	21)
	$164^{\circ} - 166^{\circ} C$	82)
Optische Drehung:		
$[\alpha]_D^{23} = -164^{\circ}$ (Methanol)	$[\alpha]_D^{20} = -180^{\circ}$ (Chloroform)	21)
	$[\alpha]_D^{23} = -164^{\circ}$ (Chloroform)	73)

Tab. 39: Gegenüberstellung der Daten des Hydrolyseproduktes Rf = 0.50 mit denen von authentischen Solasodien.

3.15. Röntgenographische Bestimmung der Konformation von Solasodin und Solasodien

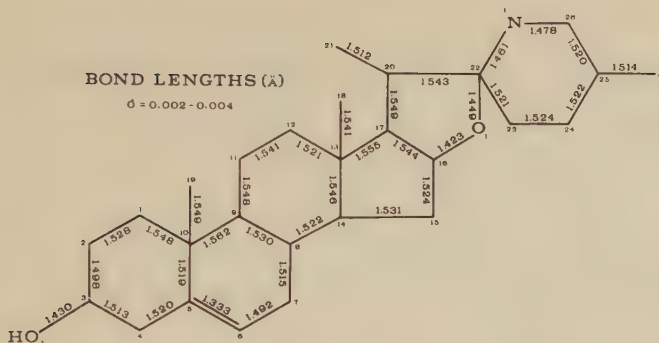
Die Untersuchungen zu diesem Kapitel der Arbeit wurden im Institut für Kristallographie der Freien Universität Berlin in Zusammenarbeit mit Herrn V. ZABEL durchgeführt. Es wurden röntgenographisch die Bindungslängen, die Bindungswinkel und die Torsionswinkel von Solasodin (= Hydrolyseprodukt Rf = 0.38) und $\Delta^{3,5}$ -Solasodien (= Hydrolyseprodukt Rf = 0.50) gemessen.

Dem Lehrbuch von BEYER⁸⁵⁾ kann entnommen werden, daß die Bindungslängen von C-C-Bindungen mit zusätzlichen π -Bindungen sich verkürzen. So betragen die Längen gemessen an den Kernabständen zwischen den beiden Atomen:

C—C -Einfachbindung	1.534 Å
C=C -Doppelbindung	1.337 Å
C $\equiv$ C -Dreifachbindung	1.207 Å

Bilden vier völlig gleichwertige sp^3 -Hybridorbitale durch Überlagerung mit den Orbitalen anderer Atome vier tetraedisch angeordnete σ -Bindungen, liegen die Ebenen der Bindungswinkel theoretisch in einem Winkel von $109^\circ 28'$ zueinander. Die Kombination eines s- mit zwei p-Atomorbitalen ergibt drei, trigonal gerichtete sp^2 -Hybridorbitale, die sich theoretisch in einer Ebene unter einem Valenzwinkel von 120° anordnen.

Die Werte für die Bindungslängen (Bond lengths) und Bindungswinkel (Bond angles) von Solasodin sind Abb. 59 und Abb. 60, die von $\Delta^{3,5}$ -Solasodien den Abbildungen 61 und 62 zu entnehmen. Wir beobachten, daß die Bindungslängen



BOND LENGTHS(Å)

$\sigma = 0.003-0.005$

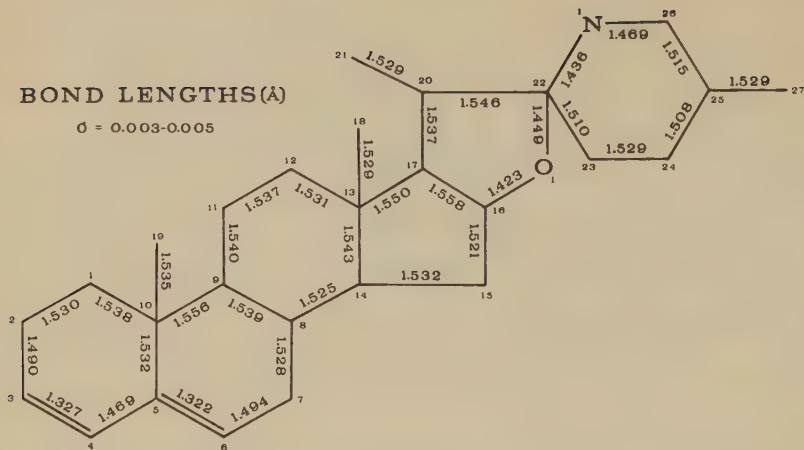
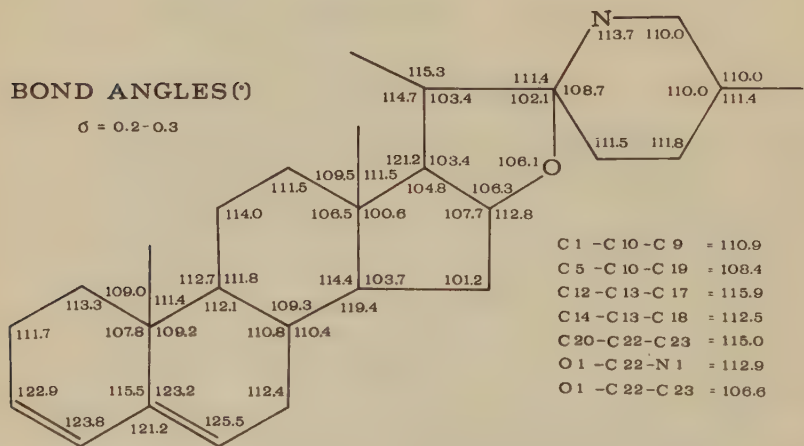


Abb. 61: Bindungslängen von Solasodien

BOND ANGLES(°)

$\sigma = 0.2-0.3$



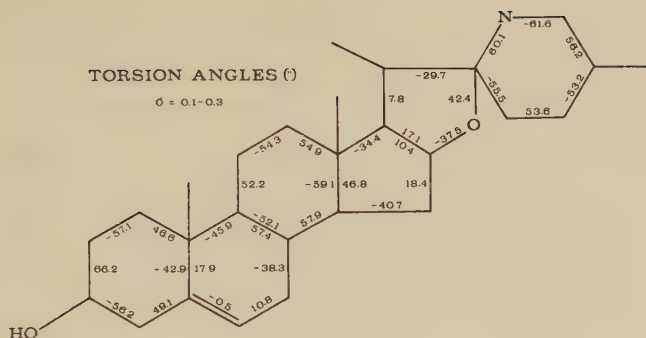


Abb. 63: Torsionswinkel von Solasodin

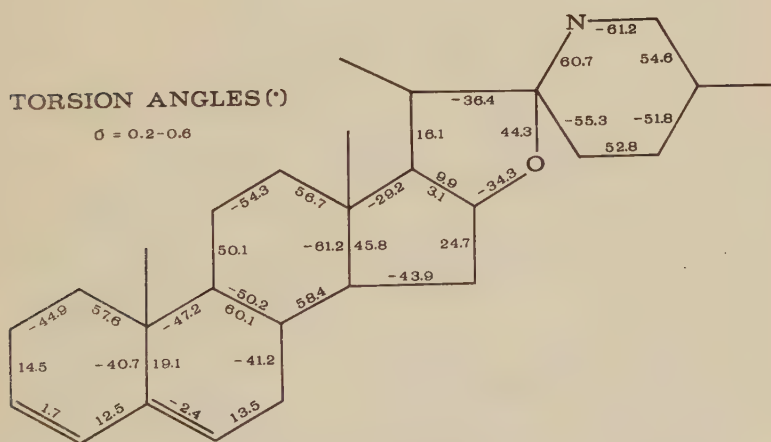


Abb. 64: Torsionswinkel von Solasodien

Der Torsionswinkel wird von 4 Atomen eines Moleküls bestimmt, wobei 2 Atome vicinal verknüpft sind. In einem System dreier aufeinanderfolgender Bindungen a, b und c, die die Atome 1,2,3 und 4 verbinden, befinden sich an der Zentralbindung b die beiden Seitenbindungen a und c. Durch die Tat-

sache, daß 3 Atome jeweils eine Ebene bilden, erhält man den Torsionswinkel, wenn man die beiden Ebenen, die durch die Atome 1,2 und 3 (gebildet aus b und a) bzw. 2,3 und 4 (gebildet aus b und c) gehen, in Beziehung setzt, da diese in einem ganz bestimmten Winkel zueinander stehen. Der Wert dieses Winkels gibt also eine genaue Bestimmung der relativen Position der vicinalen Bindungen a und c wider, was durch Abbildung 65 verdeutlicht werden soll.

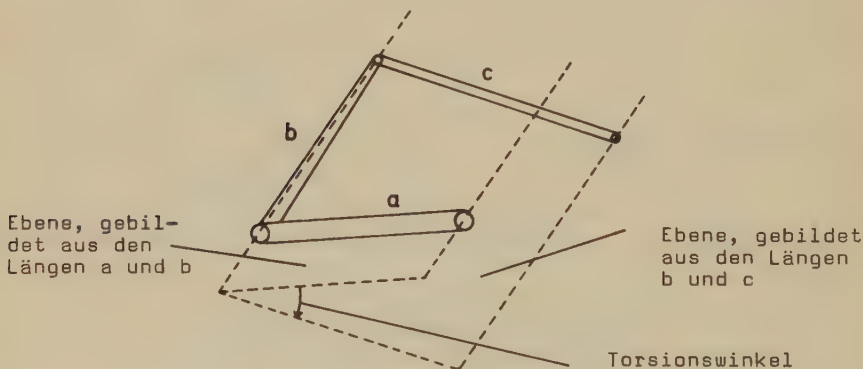


Abb. 65: Darstellung des Torsionswinkels

Der Torsionswinkel kann entweder positives oder negatives Vorzeichen aufweisen. Dieses wird durch die 'Newman-Projektion' abgeleitet. Hierbei wird senkrecht auf die Zentralbindung b geschaut. Der Winkel ist nun positiv, wenn die Drehrichtung im Uhrzeigersinn verläuft, um die vorne liegende Bindung (a) mit der hinten liegenden (c) zur Deckung zu bringen, und negativ, wenn diese Deckung entgegen dem Uhrzeigersinn verläuft.

Der Winkel muß dabei immer kleiner als 180° sein. Die 'Newman-Projektion' ist in Abbildung 66 verdeutlicht.

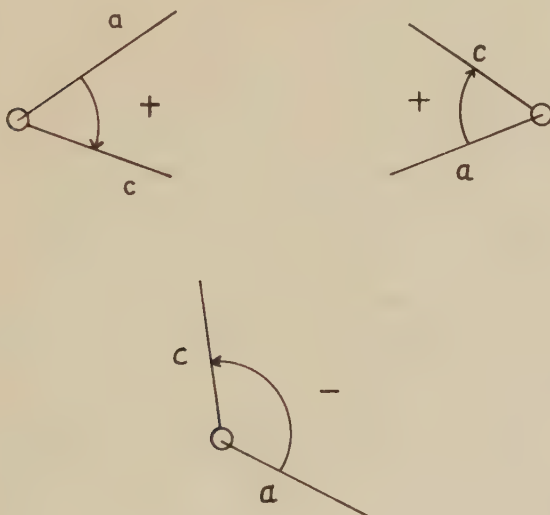
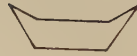
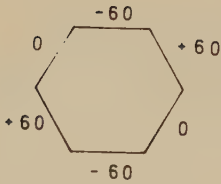


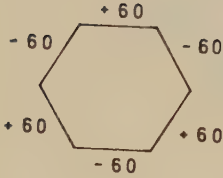
Abb. 66: Darstellung des positiven und negativen Torsionswinkels

Mit dem Torsionswinkel lassen sich auf einfache Weise die Konformationen von Molekülen beschreiben, insbesondere bei Ringsystemen. Einzelne Formen mit den jeweiligen Torsionswinkeln sind in Abbildung 67 dargestellt.

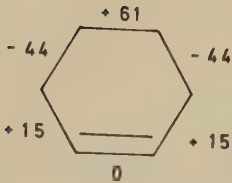
Nach der Theorie sind bei einer Sessel-Konformation die Torsionswinkel an jeder Seite etwa $\pm 60^{\circ}$. Bei einer Boot-Lage liegen nur 4 Winkel bei 60° , während 2 Winkel durch Überlagerung der Ebene nicht auftreten. Ist in einem Ringsystem eine Doppelbindung vorhanden, kann sich, bedingt durch die



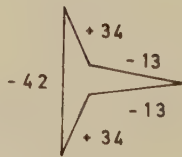
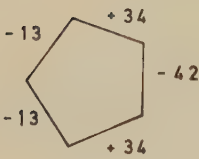
Wanne



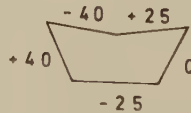
Sessel



Halbsessel



Halbsessel



Briefumschlag

Abb. 67: Darstellung der Konformationen einzelner Ringsysteme. Projektionszeichnung mit Torsionswinkel und perspektivische Zeichnung.

Veränderung des Bindungswinkels, keine 'Sessel'- oder 'Boot'-Form mehr ausbilden. So ist für Cyclohexen die 'Halbsessel'-Konformation die häufigste. Bei einer 'Halbsessel'-Konformation in einem Sechsering liegen 4 Atome in einer Ebene, eines darüber und eines darunter. Bei 5-Ring-Systemen treten die 'Halbsessel'- oder die 'Briefumschlag'-Konformation am meisten auf. In einem 'Halbsessel' befinden sich 3 Atome in einer Ebene, eines darüber und eines darunter. Bei einem 'Briefumschlag' liegen hingegen 4 Atome in einer Ebene und nur ein Atom ragt über diese Ebene heraus.

An Hand der Werte der Torsionswinkel von Solasodin und Solasodien ist am deutlichsten zu erkennen, daß die Ringe C und F bei beiden in der 'Sessel'-Konformation vorliegen. Bedingt durch die Doppelbindung Δ^5 in Ring B liegt dieser bei beiden Substanzen in der 'Halbsessel'-Konformation vor. Ring A befindet sich bei Solasodin in der energiearmen 'Sessel'-Konformation, die sich bei Solasodien nach Einführung der Δ^3 -Doppelbindung in eine 'Halbsessel'-Konformation verändert.

Die deutlichsten Konformationsunterschiede von Solasodin und Solasodien treten in den 5-Ringen auf. So ist Ring D bei Solasodin ein 'Halbsessel', da es den theoretischen Werten eines 'Halbsessels' am nächsten kommt. Bei Solasodien hingegen liegt Ring D als stark gefalteter 'Briefumschlag' vor, d.h., das fünfte Atom steht deutlich ab, da die gemessenen Werte größer als die theoretischen sind.

Während bei Solasodien die Werte des Ringes E deutlich auf eine 'Halbsessel'-Konformation hinweisen, kann dies von

Solasodin nicht behauptet werden. Doch liegen die ermittelten Werte des Solasodin-Ringes E auch nicht nahe den theoretischen Werten einer 'Briefumschlag'-Konformation. Hier liegt eine Zwischenstellung von 'Halbsessel'- und 'Briefumschlag'-Konformation vor. Tabelle 40 faßt die Folgerungen aus den Torsionswinkelmessungen beider Substanzen zusammen.

Solasodin			Solasodien		
Ring			Ring		
A	-	Sessel	A	-	Halbsessel
B	-	Halbsessel	B	-	Halbsessel
C	-	Sessel	C	-	Sessel
D	-	Halbsessel	D	-	Briefumschlag
E	-	Halbsessel (Zwischenstellung)	E	-	Halbsessel
F	-	Sessel	F	-	Sessel

Tab. 40: Auswertung der Torsionswinkelmessungen bei Solasodin und Solasodien

E I G E N E U N T E R S U C H U N G E N

4. EXPERIMENTELLER TEIL

4.1. Allgemeine Angaben

4.1.1. Chromatographie

Zur Dünnschichtchromatographie werden Platten von 20 x 20 cm Größe verwendet. Sie werden mit dem Streichgerät nach STAHL (Firma Desaga) bestrichen. Die Schichtdicke des Adsorptionsmittels (Kieselgel F Woelm DC) beträgt ca. 0.25 mm.

Die in der vorliegenden Arbeit angegebenen Rf-Werte ($hRf = Rf \times 100$) werden wegen der besseren Reproduzierbarkeit der Werte an DC-Fertigplatten Kieselgel F 254 'Merck' bestimmt.

Für die DC der nach Hydrolyse der Glykoside erhaltenen freien Zucker werden Kieselgur DC-Fertigplatten 'Camag' verwendet.

Zur Säulenchromatographie wird Kieselgel 'Woelm' (Korngröße 0.063 - 0.2 mm) verwendet.

Die Konzentrationsangaben bei Fließmitteln beziehen sich auf Volumina (v/v).

Die entwickelten Chromatogramme werden vor einer Universallampe UV-Lampe Typ TL 900 der Firma Camag ausgewertet; Emissionsmaxima wahlweise bei 366 nm und 254 nm.

Folgende Sprühreagentien werden bei der Detektion der entwickelten Chromatogramme angewendet:

(1) Reagens-Nr. 49⁴⁵⁾

Mischung von 1 Teil Chlorsulfonsäure mit 2 Teilen Eisessig (nach TSCHESCHE und WULFF⁸⁷⁾).

Optimale Farbausbildung wird nach etwa 5 min. Erhitzen bei 120° C im Trockenschrank erzielt.

(2) Reagens-Nr. 89⁴⁵⁾ Dragendorff-Reagens

Mischung von 1 ml Vorratslösung, 2 ml Eisessig und 10 ml Wasser. Die Vorratslösung entsteht durch Mischung der Lösung a (0.85 g bas. Wismutnitrat in 10 ml Eisessig und 40 ml Wasser) und der Lösung b (8 g KJ in 20 ml Wasser) zu gleichen Teilen.

(3) Reagens-Nr. 163⁴⁵⁾

Mischung aus 10.5 ml α -Naphtollösung (15 % in Äthanol), 6.5 ml H_2SO_4 , 40.5 ml Äthanol und 4 ml Wasser.

Optimale Farbausbildung wird nach etwa 10 min. Erhitzen bei 120° C im Trockenschrank erzielt.

(4) Reagens-Nr. 237⁴⁵⁾

Lösung von 0.5 g Thymol in 95 ml Äthanol und Zugabe von 5 ml H_2SO_4 .

Optimale Farbausbildung wird nach etwa 20 min. Erhitzen bei 120° C im Trockenschrank erzielt.

4.1.2. Spektroskopie

UV-Spektroskopie: Die Absorptionsspektren werden mit einem Zeiss-Spektralphotometer M4 Q III d aufgenommen. Die Konzentration beträgt 23-25 mg/l bei einer Quarzküvette mit 1 cm Schichtdicke. Als Lösungsmittel wird Methanol Uvasol 'Merck' verwendet.

IR-Spektroskopie: Die IR-Spektren werden mit einem Perkin-Elmer Photometer, Modell 621, an KBr-Preßlingen aufgenommen. Schichtdicke: 1.00 - 1.20 mg/Tabl..

Massenspektroskopie: Die Massenspektren werden mit einem CH-7-Varian MAT Massenspektrographen bei 70 eV und variablen Temperaturen aufgenommen.

Feld-Desorptions-Massenspektroskopie: Die Feld-Desorptions-Spektren werden mit einem CH-7-A-Varian Massenspektrographen bei 20 mA und variablen Temperaturen aufgenommen.

Chromatogramm-Spektrophotometrie: Die Messung der Remission der Dünnschichtchromatogramme werden mit Hilfe eines Chromatogramm-Spektrophotometers der Firma Carl Zeiss durchgeführt.

¹H-NMR-Spektroskopie: Die Kernresonanzspektren werden bei 90 MHz mit einem Braker HX-90E-Spektrographen und bei 100 MHz mit einem Varian HA-100D-Spektrographen aufgenommen. Lösungsmittel sind CDCl₃ und Pyridin-d₅; Tetramethylsilan als innerer Standard. Alle Angaben von ppm-Werten nach der δ -Skala.

4.1.3. Schmelzpunktbestimmung

Die Schmelzpunkte werden mit einem Heiztischmikroskop der Marke Mettler FP 2 bestimmt.

4.1.4. Optische Drehung

Die Messung der optischen Drehung wird mit einem Perkin-Elmer 141 Polarimeter durchgeführt.

4.1.5. Mikroanalysen

Die Mikroanalysen werden im Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin durchgeführt.

4.1.6. Gefriertrocknung

Die Gefriertrocknung der zerkleinerten Droge wird mit Hilfe einer GT 2-Apparatur der Firma Leybold-Heraeus durchgeführt.

4.2. Spezielle Angaben

4.2.1. Herkunft der Droge

Das zu untersuchende Drogenmaterial wurde im Oktober 1975 in der Gegend von Santa Rosa de Cotacachi (Equador) von Herrn L. Roth/Schering AG gesammelt und botanisch bestimmt. Belegexemplare der Pflanze werden bei der Firma Schering AG und im Institut für Pharmakognosie und Phytochemie der FU-Berlin aufbewahrt.

Das zur Verfügung stehende Drogenmaterial bestand aus ganzen, unreifen, nicht getrockneten Beeren mit einem Durchmesser von 5 cm und mehr.

4.2.2. Extraktion der Droge

16.3 kg nichtgetrocknete Droge werden in einem Mixer soweit zerkleinert, daß aus dem Fruchtmaterial eine schleimige Masse entsteht. Der Mus wird auf jeweils etwa 2 kg Droge fassende Teller geschüttet und 24 Stunden lang tiefgefroren. Die sich anschließende Gefriertrocknung der einzelnen Mengen dauert durchschnittlich 3 Tage, so daß schließlich nach Vermahlen ein gefriergetrocknetes, hellgrünes Pulver entsteht. Die Trockensubstanz hat ein Gewicht von 5.3 kg, woraus sich ein Wassergehalt der Droge von 66 % berechnen läßt.

Die gesamte Pulverdroge wird nun in ein 25 Liter fassendes, aufheizbares Gefäß gegeben und dreimal 3 Stunden lang mit jeweils 15 Litern 96%igem Äthanol bei etwa 75° C extrahiert.

Aus den gesammelten Auszügen resultieren nach Abpressen, Filtrieren und Einengen i.V. 1163 g Rückstand. Dieser Rohextrakt ergibt, an 500 g Celite gebunden und getrocknet, ein streufähiges Pulver.

4.2.3. Aufarbeitung der Fraktionen F-1 bis F-9

Dieses Pulver wird in drei gleichgroße Teile aufgetrennt und dann parallel verarbeitet:

Auf eine Säule ($\varnothing$ 7.5 cm), die mit 800 g Kieselgel der Korngröße 0.063 - 0.2 mm (aufgeschlemmt in Petroläther) beschickt ist, werden 388 g Rohextrakt (mit Celite vermengt) gegeben und mit 5 Litern Petroläther bei einer Tropfgeschwindigkeit von 100 Tr./min. eluiert. Diese lipophile Fraktion F-1 (Rückstand: $6 \text{ g} \times 3 = 18 \text{ g}$) wird nicht weiter verarbeitet, da sich bei einer dünnschichtchromatographischen Überprüfung [Fließmittel: Toluol : Aceton (95:5), Chlorsulfonsäure-Reagens] keine Steroide nachweisen lassen.

Es folgt die Elution der mehr hydrophilen Bestandteile mit dem Fließmittelgemisch Chloroform : Äthylacetat steigender Polarität. Dabei werden pro Säule jeweils 3 Liter eines bestimmten Mischungsverhältnisses der beiden Lösungsmittel verwendet, so daß ein Gesamtverbrauch von 63 Litern Lösungsmittel resultiert, der sich in 31.5 Liter Chloroform und 31.5 Liter Äthylacetat aufteilt. Nach dünnschichtchromatographischer Überprüfung [Fließmittel: Toluol : Aceton (80:20), Chlorsulfonsäure-Reagens] ergeben sich 8 verschiedene

Gläser a 20 ml	Fraktion	Lösungsmittel- gemisch CHCl ₃ : ÄAc	Menge (in g)	Rückstand DC-Werte Toluol : Aceton (80:20)
1- 414	F-2	90 : 10	21	hRf 95, hRf 90
415- 469	F-3	90 : 10 80 : 20	7	hRf 95, hRf 90, SM-1 (hRf 76)
470- 970	F-4	80 : 20 70 : 30	17	hRf 90, hRf 85, SM-1 (hRf 76)
971-1316	F-5	70 : 30	11	hRf 90, SM-1 (76) , SM-2 (55)
1317-1944	F-6	50 : 50 30 : 70	22	hRf 90, SM-2 (55)
1945-2308	F-7	30 : 70 20 : 80	7	hRf 90
2309-2897	F-8	20 : 80 10 : 90	5	hRf 90, SM-3 (hRf 13)
2898-3150	F-9	10 : 90	3	hRf 90

DC-Fließmittel: Toluol : Aceton (80:20)
Entwickelt unter Standardbedingungen (Kammersättigung, Steighöhe 16 cm)
Detektion: Chlorsulfonsäure-Reagens
hRf = Rf-Wert x 100

Tab. 41: Fraktionierung des Rohextraktes mit Chloroform : Äthylacetat (steig. Polarität)

Fraktionen: F-2 bis F-9. Die Fraktionen F-2, F-7 und F-9, in denen keine Substanz enthalten ist, die eine positive Reaktion auf das Chlorsulfonsäure-Reagens zeigt, werden nicht weiter verarbeitet. Das Resultat dieses Auftrennverfahrens ist in Tabelle 41 aufgezeigt.

4.2.3.1. Aufarbeitung der Mischfraktion F-5

Fraktion F-5 wird mit Hilfe einer Kieselgelsäule (Ø 4.5 cm, 500 g Kieselgel, Tropfgeschwindigkeit 100 Tr./min) mit 10 Litern des Fließmittels Chloroform : Äthylacetat (80:20) rechromatographiert (siehe Tabelle 42).

10 Liter		CHCl ₃ : Äac (80:20)		pro Glas 20 ml
Gläser	Fraktion	Rückstand Menge(g)		DC-Werte
1-314	F-5.1	3		hRf 90
315-357	F-5.2	1.5		hRf 90, SM-1 (76)
357-388	F-5.3	2.5		hRf 90
389-451	F-5.4	2		hRf 90, SM-2 (55)
DC-Fließmittel: Toluol : Aceton (80:20)				

Tab. 42: Rechromatographie F-5

4.2.3.2. Aufarbeitung der vereinigten Fraktionen F-3, F-4 und F-5.2; Kristallisation von SM-1

Die Fraktionen F-3, F-4 und F-5.2 werden vereinigt und mit 25 g Celite zu einem streufähigen Pulver verrieben. Auf eine mit 500 g Kieselgel beschickte Säule (Ø 4.5 cm), die

mit Chloroform : Methanol (95:5) aufgeschwemmt ist, wird das Pulver geschüttet und mit 10 Litern des Gemisches Chloroform : Methanol (95:5) eluiert. Die Tropfgeschwindigkeit wird so eingestellt, daß 20 ml/5 min. fraktioniert aufgefangen werden (siehe Tabelle 43).

10 Liter CHCl_3 : CH_3OH (95:5) pro Glas 20 ml		
Gläser	Menge	DC-Werte
1-296	13 g	hRf 90
297-467	7 g	hRf 90, SM-1 (hRf 76)
DC-Fließmittel: Toluol : Aceton (80:20)		

Tab. 43: Rechromatographie F-3, F-4 und F-5.2

Nach DC-Prüfung werden die Gläser, die die Substanz SM-1 enthalten, vereinigt, im Vakuum eingeeengt und ein weiteres Mal rechromatographiert. Als SM-1 in chromatographisch fast reiner Form vorliegt, wird die Substanz in ca. 10 ml heißem Methanol aufgenommen und im Kühlschrank bei -2°C umkristallisiert.

Die Ausbeute beträgt 1243 mg SM-1.

4.2.3.3. Eigenschaften von SM-1

Summenformel: $\text{C}_{37}\text{H}_{54}\text{O}_4$ (562.84)

C-H-Analyse : Ber.: C 78.96 % H 9.67 %

Gef.: C 78.67 % H 9.68 %

Schmelzpunkt: 252°C , Aufheizgeschwindigkeit $4^\circ/\text{min.}$,
Präparat bei 230°C aufgelegt.

Optische Drehung: $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +71^\circ$ (Pyridin, c = 1.13)

IR: (KBr)

640 (w), 660 (w), 690 (m), 715 (s), 830 (w), 845 (w), 875 (m),
930 (w), 940 (w), 965 (w), 980 (m), 995 (w), 1005 (m),
1015 (m), 1035 (s), 1075 (m), 1110 (s), 1120 (s), 1140 (sh),
1175 (s), 1200 (m), 1220 (m), 1255 (sh), 1275 (s), 1320 (m),
1330 (m), 1360 (sh), 1385 (s), 1460 (sh), 1495 (w), 1585 (w),
1605 (w), 1630 (m), 1680 (s), 1710 (s), 2810 (m), 2880 (sh),
2920 (sh), 2970 (s), 3050 (w), 3080 (w), 3100 (w), 3340 (w),
3570 (s) cm^{-1} .

MS: > m/e 100; bei 180⁰ C aufgenommen; Intensitäten in Klammer
m/e = 562(6, M^+), 441(23), 440(64), 422(11), 313(29), 312(100),
297(26), 257(47), 244(38), 173(15), 169(12), 135(10), 122(12),
119(12), 111(21), 109(27), 108(10), 107(12), 105(27).

UV: (Methanol Uvasol 'Merck')

λ_{max} = 233 nm ϵ = 19.700

NMR: (CDCl_3 , 90 MHz, ppm-Werte nach δ -Skala)

8.15 - 7.29 (5 H, m, aromatische Protonen)

8.03 (2 H, m, $J_{\text{O}}=8$ Hz, $J_{\text{m}}=3$ Hz)

7.41 (3 H, m, $J_{\text{O}}=8$ Hz, $J_{\text{m}}=3$ Hz, $J_{\text{m}}=1$ Hz)

5.68 (1 H, s, 7-H)

4.68 (1 H, m, 3-H)

3.74 (1 H, m, breit, 22-H)

2.4 - 0.5 (zahlreiche sich überlagernde Resonanzen)

0.93 (3 H, s, 19- H_3).

0.64 (3 H, s, 18- H_3).

4.2.3.4. Aufarbeitung der vereinigten Fraktionen F-5.4 und

F-6; Kristallisation von SM-2

Die Fraktionen F-5.4 und F-6 werden vereinigt, mit 25 g Cel-
lite verrieben und auf eine mit 500 g Kieselgel beschickte
Säule ($\varnothing$ 4.5 cm) gebracht. Es wird mit 10 Litern des Fließ-
mittelgemisches Chloroform : Methanol (80:20) eluiert (Tab. 44).

10 Liter CHCl_3 : CH_3OH (80:20) pro Glas 20 ml		
Gläser	Menge (g)	DC-Werte
1-241	14	hRf 90
242-403	7	hRf 90, SM-2 (hRf 55)
DC-Fließmittel: Toluol : Aceton (80:20)		

Tab. 44: Rechromatographie F-5.4 und F-6

Nach DC-Prüfung werden die SM-2 enthaltenden Gläser vereinigt, im Vakuum eingeengt und ein weiteres Mal rechromatographiert. Anschließend wird mit 10 ml Methanol umkristallisiert.

Die Ausbeute beträgt 1418 mg SM-2.

4.2.3.5. Eigenschaften von SM-2

Summenformel: $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$ (414.72)

C-H-Analyse : Ber.: C 83.99 % H 12.15 %

Gef.: C 83.73 % H 12.08 %

Schmelzpunkt: $134^\circ - 137^\circ \text{C}$, Aufheizgeschw. $4^\circ/\text{min.}$,
Präparat bei 110°C aufgelegt.

Optische Drehung: $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = -39^\circ$ (Pyridin, $c = 0.92$)

IR: (KBr)

595 (w), 630 (w), 745 (w), 800 (m), 840 (m), 885 (w), 925 (w),
960 (m), 975 (w), 990 (w), 1025 (m), 1045 (sh), 1060 (s),
1105 (w), 1130 (w), 1155 (w), 1190 (m), 1240 (w), 1255 (w),
1330 (w), 1365 (w), 1375 (s), 1440 (sh), 1465 (s), 1630 (w),
1670 (w), 2870 (sh), 2940 (s), 2970 (s), 3420 (sh),
3450 (s) cm^{-1} .

Ms: (>m/e 100; bei 120⁰ C aufgenommen; Intensitäten in Klammer)
m/e = 415(33), 414(100,M⁺), 412(19), 401(11), 400(21), 399(19),
396(32), 386(20), 382(13), 381(14), 330(12), 329(42), 315(13),
303(20), 302(13), 301(13), 300(13), 274(11), 273(36), 272(10),
271(17), 255(35), 231(26), 229(10), 213(26), 199(10), 178(26),
173(13), 163(25), 161(24), 160(17), 159(18), 149(16), 147(19),
145(22), 137(11), 135(17), 133(19), 131(12), 125(10), 121(15),
119(13), 111(13), 109(19), 107(21), 105(16).

NMR: (CDCl₃, 90 MHz, ppm-Werte nach δ -Skala)

5.37 (1 H,m,6-H)

3.5 (1 H,m,breit,3-H)

2.4 - 0.6 (zahlreiche sich überlagernde Resonanzen)

1.02 (3 H,s,19-H₃)

0.66 (3 H,s,18-H₃).

4.2.3.6. Aufarbeitung der Fraktion F-8; Kristallisation von SM-3

Fraktion F-8 wird mit 5 g Celite verrieben und auf eine mit
250 g Kieselgel beschickte Säule ($\emptyset$ 2.5 cm) gebracht. Es wird
mit 5 Litern des Gemisches Chloroform : Aceton (30:70)
chromatographiert (siehe Tabelle 45).

5 Liter CHCl ₃ : Aceton (30:70) pro Glas 20 ml		
Gläser	Menge(g)	DC-Werte
1- 96	2.5	hRf 90
97-123	-	-
124-209	1	SM-3 (hRf 31)
DC-Fließmittel: Toluol : Aceton (80:20)		

Tab. 45: Rechromatographie F-8

Die Gläser 124-209 werden vereinigt, i.V. eingeeengt und mit 5 ml heißem Methanol umkristallisiert.

Die Ausbeute beträgt 389 mg SM-3.

4.2.3.7. Hydrolyse von SM-3

100 mg SM-3 werden in 9,5 ml 80%igem Äthanol gelöst und nach Zugabe von 0.5 ml H_2SO_4 conc. 6 Stunden lang auf dem Wasserbad unter Rückfluß gekocht. Nach Abkühlen der Lösung wird mit wenig $BaCO_3$ neutralisiert und das ausgefallene $BaSO_4$ abzentrifugiert. Die Hydrolyselösung wird dünnschicht-chromatographisch mit Kieselgur 'Camac' Fertigplatten qualitativ auf Zucker und mit Kieselgel 'Merck' Fertigplatten auf das Steroid-Aglykon untersucht.

4.2.3.8. Eigenschaften von SM-3

Summenformel : $C_{35}H_{60}O_6$ (576.87)

C-H-Analyse : Ber.: C 72.87 % H 10.48 %

Gef.: C 72.71 % H 10.46 %

Schmelzpunkt : $292^{\circ} - 295^{\circ} C$, Aufheizgeschwindigkeit $4^{\circ}/min.$,
Präparat bei $200^{\circ} C$ aufgelegt.

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{23} = -40^{\circ}$ (Pyridin, $c = 0.96$)

IR: (KBr)

600 (w), 625 (w), 660 (w), 725 (w), 805 (m), 845 (w), 890 (w),
930 (w), 965 (w), 1025 (s), 1070 (sh), 1105 (sh), 1170 (m),
1255 (w,breit), 1365 (sh), 1465 (m), 1630 (w), 1745 (s),
2880 (s), 2940 (s), 2970 (sh), 3420 (s,breit) cm^{-1} .

MS: ($>m/e$ 100; bei $190^{\circ} C$ aufgenommen; Intensitäten in Klammer)
 $m/e = 414(26), 398(15), 397(54), 396(100), 394(17), 382(19),$
 $381(13), 369(11), 329(12), 288(14), 275(14), 273(107), 255(26),$
 $229(10), 213(14), 163(17), 161(23), 160(14), 159(14), 149(18),$

148(13), 147(30), 146(10), 145(23), 137(10), 133(14), 131(10), 125(10), 123(14), 121(17), 119(10), 111(17), 109(22), 107(16), 105(10).

NMR: (Pyridin-d₅, 90 MHz, ppm-Werte nach δ -Skala)

5.35 (1 H,m,6-H)

5.1 - 3.9 (zahlreiche sich überlagernde Resonanzen)

5.04 (1 H,d,J=7 Hz,1-C-H von Gluköse)

2.65 (1 H,m,breit,3-H)

2.2 - 0.5 (zahlreiche sich überlagernde Resonanzen)

0.96 (3 H,s,19-H₃)

0.68 (3 H,s,18-H₃)

4.2.3.9. Acetylierung der Substanz SM-3

100 mg SM-3 werden in 1 ml Pyridin gelöst, mit 2 ml wasserfreiem Essigsäureanhydrid versetzt und 24 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach wird das Ganze auf 20 g Eis gegossen und bis zum Auftauen stehengelassen. Die wässrige Lösung wird fünfmal mit Äther ausgeschüttelt. Die ätherische Phase wird bis zur schwach sauren Reaktion mit 0.1n HCl-Lösung versetzt, mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum bis zur Trockene eingeeengt. Nach Umkristallisation mit Methanol werden 28 mg Tetra-o-acetyl-Derivat erhalten.

4.2.3.10. Eigenschaften von SM-3-acetyliert

Summenformel: C₄₃H₆₈O₁₀ (745.01)

Schmelzpunkt: 167° - 169° C

NMR: (CDCl_3 , 90 MHz, ppm-Werte nach δ -Skala)

5.37 (1 H, m, 6-H)

5.2 - 3.9 (zahlreiche sich überlagernde Resonanzen)

5.16 (1 H, d, $J=7$ Hz, 1-C-H von Glukose)

3.65 (1 H, m, breit, 3-H)

2.3 - 0.6 (zahlreiche sich überlagernde Resonanzen)

2.06, 2.05, 2.03, 2.01 (12 H, breites Signal mit 4 Spitzen, 4 Acetoxy-Gruppen)

0.99 (3 H, s, 19- H_3)

0.61 (3 H, s, 18- H_3).

4.2.4. Aufarbeitung der Fraktion F-10

Nach quantitativer Elution des Rohextraktes mit 90 Litern Methanol bleibt nach Verdampfen des Lösungsmittels i.V. ein Rückstand von 642 g zurück, der als F-10 bezeichnet wird. F-10 wird mit 400 g Celite vermengt und auf eine mit 1200 g Kieselgel beschickte Säule ($\varnothing$ 7.5 cm) gegeben. Chromatographiert wird mit 20 Litern der unteren Phase des Gemisches Chloroform : Äthanol : NH_3 (1%ig) (20:20:10). Nach DC-Überprüfung lassen sich 5 Fraktionen (F-10.1 bis F-10.5) einteilen und drei auf das Chlorsulfonsäure-Reagens positiv reagierende Substanzen (SM-4, SM-5 und SM-6) erkennen. Die Ergebnisse der Fraktionierung von F-10 sind in Tabelle 46 zusammengefaßt.

4.2.4.1. Aufarbeitung der Mischfraktion F-10.2

Fraktion F-10.2 wird mit 7 Litern des Gemisches Chloroform : Äthanol : NH_3 (1%ig) (untere Phase) an einer mit 600 g Kieselgel beschickten Säule ($\varnothing$ 4.5 cm) rechromatographiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 47 aufgeführt.

Gläser a 20 ml	Fraktion	Lösungsmittel	Rückstand	
			Menge (in g)	DC-Werte
1- 312	F-10-1	Chloroform : Äthanol : NH ₃ (1%ig) (20:20:10, untere Phase)	179	hRf 90, hRf 80
313- 420	F-10-2		113	hRf 80, SM-4 (hRf 44)
421- 628	F-10-3		96	hRf 80, SM-4 (44) , SM-5 (31)
629- 970	F-10-4		100	hRf 80, SM-5 (31) , SM-6 (15)
971-1000	F-10-5		-	hRf 80
DC-Fließmittel: Chloroform : Äthanol : NH ₃ (1%ig) (20:20:10, untere Phase)				

Tab. 46: Fraktionierung von F-10

Elution mit 7 Liter Chloroform : Äthanol : NH ₃ (1%ig) (20:20:10, untere Phase)				
Gläser a 20 ml	Fraktion	Menge (in g)	Rückstand	
			DC-Werte	
1-303	F-10.2.1	85	hRf 80	
304-348	F-10.2.2	9	SM-4 (hRf 44)	
DC-Fließmittel: Chloroform : Äthanol : NH ₃ (1%ig) (20:20:10, untere Phase)				

Tab. 47: Rechromatographie von F-10.2

Elution mit 10 Liter Chloroform : Äthanol : NH_3 (1%ig) (20:20:10, untere Phase)			
Gläser a 20 ml	Fraktion	Menge (g)	Rückstand DC-Werte
1-305	F-10.3.1	51	hRF 80
306-409	F-10.3.2	12	hRF 80, SM-4 (hRF 44)
410-491	F-10.3.3	9	SM-5 (hRF 31)
DC-Fließmittel: Chloroform : Äthanol : NH_3 (1%ig) (20:20:10, untere Phase)			

Tab. 48: Rechromatographie von F-10-3

Elution mit 15 Liter Chloroform : Äthanol : NH_3 (1%ig) (20:20:10, untere Phase)			
Gläser a 20 ml	Fraktion	Menge (in g)	Rückstand DC-Werte
1-391	F-10.4.1	35	hRF 80
392-499	F-10.4.2	31	SM-5 (hRF 31)
500-733	F-10.4.3	15	SM-6 (hRF 15)
DC-Fließmittel: Chloroform : Äthanol : NH_3 (1%ig) (20:20:10, untere Phase)			

Tab. 49: Rechromatographie von F-10-4

4.2.4.2. Aufarbeitung der Mischfraktion F-10.3

Fraktion F-10.3 wird mit 10 Litern des Gemisches Chloroform : Äthanol : NH_3 (1%ig) (untere Phase) an einer mit 600 g Kieselgel beschickten Säule rechromatographiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 48 aufgeführt.

4.2.4.3. Aufarbeitung der Mischfraktion F-10.4

Fraktion F-10.4 wird mit 15 Litern des Gemisches Chloroform : Äthanol : NH_3 (1%ig) (untere Phase) an einer mit 600 g Kieselgel beschickten Säule ($\varnothing$ 4.5 cm) rechromatographiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 49 aufgeführt.

4.2.4.4. Aufarbeitung der vereinigten Fraktionen F-10.2.2 und F-10.3.2; Kristallisation von SM-4

Die beiden Fraktionen F-10.2.2 und F-10.3.2 werden vereinigt, mit 20 g Celite vermengt und auf eine mit 500 g Kieselgel beschickte Säule ($\varnothing$ 4.5 cm) gegeben. Als Fließmittel dient 5 Liter n-Butanol (wassergesättigt). Nach Abdampfen des Lösungsmittels der einzelnen die Substanz SM-4 enthaltenden Fraktionen wird mit 50 ml 75%igem Äthanol umkristallisiert.

Die Ausbeute beträgt 12.4 g SM-4.

4.2.4.5. Eigenschaften von SM-4

Summenformel: $\text{C}_{45}\text{H}_{73}\text{NO}_{15}$ (868.04)

C-H-N-Analyse:	Ber.:	C 62.26%	H 8.48%	N 1.61%
	Gef.:	C 60.81%	H 8.52%	N 1.62%

Schmelzpunkt: 300°C , Aufheizgeschwindigkeit $4^{\circ}/\text{min.}$,
Präparat bei 240°C aufgelegt.

Optische Drehung: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -94^{\circ}$ (Methanol, $c = 0.96$)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -95^{\circ}$ (Pyridin, $c = 1.18$)

IR: (KBr)

655 (w), 680 (w), 755 (w), 790 (w), 810 (m), 835 (m), 880 (m),
895 (m), 975 (m), 1060 (sh), 1105 (sh), 1130 (sh), 1200 (w),
1250 (w), 1290 (w), 1345 (m), 1380 (m), 1455 (sh), 1640 (m),
2850 (sh), 2900 (sh), 2940 (sh), 3400 (s, breit) cm^{-1} .

MS: ($>m/e$ 100; bei 250°C aufgenommen; Intensitäten in Klammer)
 $m/e = 413(17)$, $396(11)$, $385(10)$, $145(10)$, $144(42)$, $139(18)$,
 $138(99)$, $128(12)$, $126(27)$, $125(23)$, $124(19)$, $115(15)$, $114(100)$,
 $113(89)$, $111(19)$, $110(13)$, $105(10)$, $100(42)$.

NMR: (Pyridin- d_5 , 90 MHz, ppm-Werte nach δ -Skala)

6.39 (1 H, d, $J=2$ Hz, 1-C-H von Rhamnose)

5.84 (1 H, d, $J=1.5$ Hz, 1-C-H von Rhamnose)

5.34 (1 H, m, 6-H)

4.82 (1 H, d, $J=7$ Hz, 1-C-H von Glukose)

2.78 (2 H, m, 26- H_2)

2.4 - 0.6 (zahlreiche sich überlagernde Resonanzen)

1.77 (3 H, d, $J=6$ Hz, 6- CH_3 von Rhamnose)

1.64 (3 H, d, $J=7$ Hz, 6- CH_3 von Rhamnose)

1.06 (3 H, s, 19- H_3)

0.89 (3 H, s, 18- H_3).

4.2.4.6. Aufarbeitung der vereinigten Fraktionen F-10.3.3 und F-10.4.2; Kristallisation von SM-5

Die beiden Fraktionen F-10.3.3 und F-10.4.2 werden vereinigt, mit 400 g Celite verrieben und auf eine mit 500 g Kieselgel beschickte Säule ($\varnothing$ 4.5 cm) gegeben. Als Fließmittel dienen 7 Liter n-Butanol(wassergesättigt). Nach

Abdampfen des Lösungsmittels der einzelnen die Substanz SM-5
den Gläser wird mit 50 ml 96%igem Äthanol um-
kristallisiert.

Die Ausbeute beträgt 16.2 g SM-5.

4.2.4.7. Eigenschaften von SM-5

Summenformel: $C_{45}H_{73}NO_{16}$ (884.09)

C-H-N-Analyse: Ber.: C 61.14% H 8.32% N 1.58%
Gef.: C 60.99% H 8.40% N 1.52%

Schmelzpunkt: $286^{\circ} - 288^{\circ} \text{ C}$, Aufheizgeschw. $4^{\circ}/\text{min.}$,
Präparat bei 240° C aufgelegt.

IR: (KBr)

600 (w), 630 (m), 670 (w), 695 (w), 710 (w), 780 (w), 810 (m),
835 (m), 890 (m), 900 (m), 915 (m), 965 (m), 980 (sh),
990 (sh), 1040 (sh), 1065 (sh), 1135 (sh), 1185 (m), 1225 (m),
1250 (w), 1265 (w), 1295 (w), 1350 (m), 1365 (m), 1380 (m),
1450 (m), 1630 (w), 2850 (sh), 2900 (sh), 2950 (sh),
3410 (s,breit) cm^{-1} .

MS: ($>m/e$ 100; bei 260° aufgenommen; Intensitäten in Klammer)
 $m/e = 413(16)$, $385(10)$, $139(13)$, $138(75)$, $128(60)$, $126(19)$,
 $125(13)$, $124(10)$, $115(10)$, $114(100)$, $113(73)$, $112(10)$,
 $111(13)$, $110(11)$, $98(10)$.

NMR: (Pyridin- d_5 , 90 MHz, ppm-Werte nach δ -Skala)

5.78 (1 H,d,J=1.5 Hz,1-C-H von Rhamnose)

5.31 (1 H,m,6-H)

4.96 (1 H,d,J=7 Hz,1-C-H von Glukose)

4.7 - 3.6 (zahlreiche sich überlagernde Resonanzen)

2.80 (2 H,m,26-H₂)

2.4 - 0.6 (zahlreiche sich überlagernde Resonanzen)

1.73 (3 H,d,J=6 Hz,6-CH₃ von Rhamnose)

0.84 (3 H,s,19-H₃)

0.80 (3 H,s,18-H₃).

4.2.4.8. Aufarbeitung der Fraktion F-10.4.3; Kristallisation von SM-6

Fraktion F-10.4.3 wird mit 10 g Celite verrieben und auf eine mit 400 g Kieselgel beschickte Säule ($\varnothing$ 4.5 cm) gebracht. Als Fließmittel dienen 10 Liter n-Butanol(wassergesättigt). Nach Abdampfen des Lösungsmittels der einzelnen die Substanz SM-6 enthaltenden Gläser wird mit 40 ml heißem Methanol umkristallisiert.

Die Ausbeute beträgt 7.6 g SM-6.

4.2.4.9. Bestimmung des D-Glukose- und D-Galaktose-Anteils im Zuckerrest der Substanz SM-6

52 mg SM-6 werden in 7 ml 50%igem Äthanol gelöst. Nach Zusatz von 2 ml HCl(15%) wird die Lösung auf dem Wasserbad 3 Stunden lang unter Rückfluß gekocht. Nach dem Erkalten wird die Lösung mit frisch gefälltem AgCO_3 neutralisiert. Das Hydrolysat wird anschließend in einen 10 ml Meßkolben filtriert und mit 50%igem Äthanol bis zum Erreichen der Markierung nachgewaschen.

10 mg D-Glukose bzw. D-Galaktose werden ebenso aufgearbeitet.

Von diesen drei Lösungen werden jeweils gleiche Mengen (10 μl , 15 μl , 20 μl) auf eine Kieselgur DC-Fertigplatte 'Camac' aufgetragen, in dem Fließmittel n-Butanol : Pyridin : Wasser (90:50:20) entwickelt, mit Thymol-Schwefelsäure (Reagens-Nr. 237⁴⁵) besprüht und 20 Minuten bei 130° C erhitzt. Die sich ergebenden rotgefärbten Flecken werden mit Hilfe eines Chromatogramm-Spektralphotometers ausgewertet. Die Integration der Kurven erfolgt einmal durch Übertragen der Kurven auf Millimeterpapier und Messen der Fläche unter den

Kurven in mm^2 . Zum anderen wird das Papier unter den Kurven ausgeschnitten und gewogen. Die dabei erhaltenen Werte (mm^2 bzw. mg) werden mit nachstehender Formel auf deren Menge Zucker (in mg) berechnet:

z = Auftragsmenge Lösung

$$z \mu\text{l} \frac{10 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} = \text{Remission}_{\text{Vergleichslösung}} [\text{in mm}^2]$$

$$z' \mu\text{l} \frac{x \text{ mg}}{10 \text{ ml}} = \text{Remission}_{\text{Analyse}} [\text{in mm}^2]$$

Bei $z = z'$ ist

$$x = \frac{10 \cdot \text{Remission}_{\text{Analyse}}}{\text{Remission}_{\text{Vergleichslsg}}} [\text{in mg}].$$

4.2.4.10. Eigenschaften von SM-6

Summenformel: $\text{C}_{51}\text{H}_{83}\text{NO}_{21}$ (1046.23)

C-H-N-Analyse: Ber.: C 58.55% H 8.00% N 1.40%

Gef.: C 58.15% H 8.05% N 1.44%

Schmelzpunkt: $275^\circ - 278^\circ \text{ C}$, Aufheizgeschw. $4^\circ/\text{min.}$,
Präparat bei 230° C aufgelegt.

Optische Drehung: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -87^\circ$ (Methanol, $c = 1.31$)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -81^\circ$ (DMF, $c = 0.92$)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -90^\circ$ (Pyridin, $c = 1.14$)

IR: (KBr)

630 (w), 675 (w), 755 (w), 770 (w), 790 (w), 815 (w), 835 (w),
880 (m), 900 (m), 915 (w), 955 (w), 965 (m), 980 (m), 1055 (s),
1140 (sh), 1200 (w), 1250 (w), 1290 (w), 1305 (w), 1355 (m),
1380 (m), 1455 (m), 1640 (m), 2850 (sh), 2900 (sh), 2940 (sh),
3400 (s, breit) cm^{-1} .

MS: ($>m/e$ 100; bei 240° aufgenommen; Intensitäten in Klammer)
 $m/e = 413(21), 396(17), 385(12), 378(10), 253(17), 161(10),$
 $152(16), 151(14), 150(23), 147(14), 139(24), 138(84), 129(15),$
 $128(38), 126(15), 125(51), 124(15), 121(10), 115(14), 114(100),$

113(77), 112(13), 111(17), 110(11), 109(13), 107(10),
105(14).

NMR: (Pyridin- d_5 , 90 MHz, ppm-Werte nach δ -Skala)

6.22 (1 H, d, $J=1.5$ Hz, 1-C-H von Rhamnose)

5.34 (1 H, m, 6-H)

5.14 (1 H, d, $J=7$ Hz, 1-C-H von Galaktose)

4.87 (2 H, d, $J=7$ Hz, 1-C-H von Glukose x 2)

2.82 (2 H, m, 26- H_2)

2.5 - 0.5 (zahlreiche sich überlagernde Resonanzen)

1.70 (3 H, d, $J=6$ Hz, 6- CH_3 von Rhamnose)

1.08 (3 H, s, 19- H_3)

0.88 (3 H, s, 18- H_3).

4.2.4.11. Hydrolyse der einzelnen Glykoside (SM-4, SM-5 und SM-6)

200 mg Glykosid (SM-4, SM-5, SM-6) werden in 9.5 ml 80%igem Äthanol gelöst und anschließend mit 0.5 ml H_2SO_4 versetzt. Nach sechsstündigem Kochen unter Rückfluß auf dem Wasserbad wird die filtrierte abgekühlte Lösung mit wenig $BaCO_3$ neutralisiert und ausgefallenes $BaSO_4$ abzentrifugiert.

Die Hydrolyselösung wird dünnschichtchromatographisch qualitativ auf die aglykonischen Hydrolysebestandteile und nach COUNE und DENDÉL⁶⁶⁾ mit Kieselgur 'Camac' Fertigplatten auf die Zuckerbestandteile der einzelnen Glykoside untersucht. Abbildung 68 gibt das Ergebnis dieser Untersuchung wider.

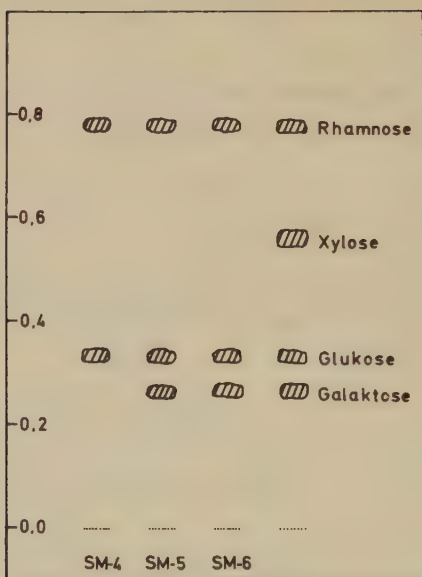


Abb. 68: Zuckerbestandteile von SM-4, SM-5 und SM-6 nach DC-Untersuchung

4.2.5. Isolierung und Kristallisation der aglykonischen Hydrolyseprodukte

Jeweils 2 g SM-4, SM-5 und SM-6 werden vermengt, in 95 ml 80%igem Äthanol gelöst und nach Versetzen mit 5 ml H_2SO_4 conc. 6 Stunden lang auf dem Wasserbad unter Rückfluß gekocht. Nach Abkühlen der Hydrolyselösung wird 100 ml Wasser und anschließend NH_4OH im Überschuß hinzugefügt. Der Rückstand wird abgenutscht (Wasserstrahlpumpe) und mit Chloroform/ Wasser ausgeschüttelt. Die organische Phase wird i.V. eingengt, mit 5 g Celite versetzt und auf

eine Kieselgelsäule ($\varnothing$ 3.0 cm, 200 g Kieselgel) gebracht. Es wird mit 3 Litern des Gemisches Chloroform : Methanol (95:5) eluiert (siehe Tabelle 50).

3 Liter CHCl_3 : CH_3OH (95:5) pro Glas 20 ml		
Gläser	Menge	DC-Werte
1- 56	0.4 g	-
57- 96	1.0 g	(hRf 50)
96-110	-	-
111-143	1.5 g	(hRf 38)
DC-Fließmittel: Chloroform : Aceton (90:10)		

Tab. 50: Fraktionierung der aglykonischen Hydrolyseprodukte

Der Inhalt der Gläser 57-96 wird i.V. eingengt und anschließend mit 90%igem Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 579 mg Hydrolyseprodukt Rf = 0.50.

Der Inhalt der Gläser 111-143 wird i.V. eingengt und mit 90%igem Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 813 mg Hydrolyseprodukt Rf = 0.38.

Reaktion nach ROSENHEIM⁸⁰⁾: 5 mg Substanz (Hydrolyseprodukt Rf = 0.50) werden in etwa 3 ml Chloroform gelöst und das gleiche Volumen einer Lösung von 9 Teilen Trichloressigsäure in 1 Teil Wasser hinzugegeben. Es tritt bei Anwesenheit von Verbindungen, die konjugierte Doppelbindungen enthalten, eine rotviolette Färbung auf, die allmählich in Hellblau und Grün übergeht.

4.2.5.1. Eigenschaften des Hydrolyseproduktes $R_f = 0.38$
(= Solasodin)

Summenformel: $C_{27}H_{43}NO_2$ (413.65)

C-H-N-Analyse: Ber.: C 78.40% H 10.48% N 3.39%

Gef.: C 76.48% H 10.22% N 3.12%

Schmelzpunkt: $201^{\circ} \sim 203^{\circ}$ C, Aufheizgeschw: $4^{\circ}/\text{min.}$,

Präparat bei 170° C aufgelegt.

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{23} = -92^{\circ}$ (Methanol, $c = 1.08$)

IR: (KBr)

635 (m), 665 (sh), 730 (w), 750 (w), 790 (m), 810 (w), 835 (m),
875 (m), 885 (s), 895 (s), 965 (s), 980 (s), 1000 (w),
1025 (m), 1075 (sh), 1100 (m), 1140 (s), 1160 (w), 1195 (m),
1240 (sh), 1295 (w), 1350 (sh), 1380 (s), 1455 (sh), 1675 (m),
2750 (w), 2850 (s), 2875 (m), 2900 (m), 2940 (sh), 2950 (sh),
2970 (m), 3030 (w), 3360 (s), 3410 (s), 3460 (s, breit) cm^{-1} .

MS: ($>m/e$ 100; bei 150° C aufgenommen; Intensität in Klammer)
 $m/e = 413(14, M^+)$, 385(10), 138(76), 125(9), 124(11), 114(100),
113(61).

NMR: (CDCl_3 , 100 MHz, ppm-Werte nach δ -Skala)

5.34 (1 H, m, 6-H)

4.28 (1 H, m, 16-H)

3.50 (1 H, m, 3-H)

2.62 (2 H, m, 26-H₂)

2.4 - 0.6 (zahlreiche sich überlagernde Resonanzen)

1.02 (3 H, s, 19-H₃)

0.94 (3 H, d, $J=6$ Hz, 21-H₃)

0.85 (3 H, d, $J=6$ Hz, 27-H₃)

0.82 (3 H, s, 18-H₃).

4.2.5.2. Eigenschaften des Hydrolyseproduktes $R_f = 0.50$

(= Solasodien)

Summenformel: $C_{27}H_{41}NO$ (395.64)

C-H-N-Analyse: Ber.: C 81.97% H 10.45% N 3.54%

Gef.: C 81.42% H 10.43% N 3.38%

Schmelzpunkt: $169^{\circ} - 172^{\circ} \text{ C}$, Aufheizgeschw. $4^{\circ}/\text{min.}$,

Präparat bei 140° C aufgelegt.

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{23} = -164^{\circ}$ (Methanol, $c = 0.98$)

IR: (KBr)

615 (s), 675 (w), 725 (s), 750 (m), 765 (w), 790 (m), 805 (w),
825 (w), 840 (s), 880 (s), 900 (s), 915 (w), 935 (w), 965 (s),
975 (s), 1010 (w), 1025 (sh), 1060 (m), 1090 (s), 1105 (m),
1125 (w), 1140 (m), 1170 (w), 1190 (m), 1250 (sh), 1290 (w),
1305 (m), 1350 (m), 1380 (sh), 1430 (m), 1465 (sh), 1650 (w),
2875 (s), 2900 (sh), 2920 (s), 2950 (sh), 3020 (m) cm^{-1} .

UV: (Methanol Uvasol 'Merck')

$\lambda_{\text{max}} = 227 \text{ nm}$ $\epsilon = 18.200$

$\lambda_{\text{max}} = 234 \text{ nm}$ $\epsilon = 19.400$

MS: ($>m/e$ 100; bei 160° C aufgenommen; Intensität in Klammer)
 $m/e = 395(32, M^+)$, 367(18), 282(10), 253(7), 145(11), 139(16),
138(100), 125(10), 124(11), 114(96), 113(91), 105(13).

NMR: (CDCl_3 , 100 MHz, ppm-Werte nach δ -Skala)

5.92 (1 H, d, $J=10 \text{ Hz}$, 4-H)

5.60 (1 H, m, 3-H)

5.37 (1 H, m, 6-H)

4.28 (1 H, m, 16-H)

2.64 (2 H, m, 26- H_2)

2.4 - 0.6 (zahlreiche sich überlagernde Resonanzen)

0.97 (3 H, s, 19- H_3)

0.87 (3 H, s, 18- H_3).

5. ZUSAMMENFASSUNG

(1) Es wurden die Früchte der zur Familie der Solanaceae zugeordneten Art *Solanum marginatum* - und zwar eine aus Ecuador stammende Sorte - untersucht und auf das Vorkommen von Steroiden geprüft.

(2) Im methanolischen Auszug des *Solanum marginatum*-Extraktes wurden drei stärker polare Steroidglykoside nachgewiesen, die bei der DC sowohl auf das Chlorsulfonsäure- als auch auf das Dragendorff-Reagens positiv reagierten. Die Methanolfraktion wurde säulenchromatographisch (Verteilungschromatographie) aufgetrennt und die alkaloidhaltige Fraktion durch Rechromatographie (Adsorptionsschromatographie) weiter gereinigt.

Drei Alkaloide [$F = 300^{\circ} \text{C}$ (Laborbezeichnung: SM-4), $F = 286^{\circ} - 288^{\circ} \text{C}$ (Laborbezeichnung: SM-5) und $F = 275^{\circ} - 278^{\circ} \text{C}$ (Laborbezeichnung: SM-6)] konnten in kristalliner Form gewonnen werden und wurden physikalisch-chemisch und spektroskopisch charakterisiert.

Der Inhaltsstoff SM-4 erwies sich identisch mit dem bereits bekannten Solamargin, dem (3 β ,22R,25R)-Spirosol-5-en-3-yl- α -L-Rhamnopyranosido-(1 $\rightarrow$ 2)-O- α -L-Rhamnopyranosido-(1 $\rightarrow$ 4)-O- β -D-Glukopyranosyl. Diese Substanz ist schon früher in einer auf Neu-Seeland wachsenden Sorte beschrieben worden.

Alkaloid SM-5 ist ebenfalls schon früher aus auf Neu-Seeland wachsenden Sorten von *Solanum marginatum* isoliert worden und erwies sich mit Solasonin, dem (3 β ,22R,25R)-Spirosol-5-en-3-yl-O- α -L-Rhamnopyranosido-(1 $\rightarrow$ 2)-O- β -D-Glucopyranosido-

-(1→3)-O-β-D-Galactopyranosyl, identisch.

Das Alkaloid mit der vorläufigen Bezeichnung SM-6, ein Solasodin-Tetraosid, ist bisher in der Literatur nicht beschrieben worden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Teilstruktur des Moleküls ermittelt. Es handelt sich um (3β,22R,25R)-Spirosol-5-en-3-yl-O-α-L-Rhamnopyranosyl-(1→2)-β-D-Glucopyranosyl mit einer β-D-Glukose und einer β-D-Galaktose, deren Verknüpfungsstelle an dem Biosid nicht ermittelt werden konnten.

Die eigenen Ergebnisse wurden mit denen älterer Untersuchungen verglichen: Hinsichtlich der Alkaloidführung unterscheiden sich die aus Equador stammenden von der auf Neu-Seeland wachsenden und von L.H. BRIGGS untersuchten Sorte.

(3) Mit einem Chloroform/Äthylacetat-Gemisch steigender Polarität konnten drei stärker lipophile Steroide säulenchromatographisch (Adsorptionschromatographie) angereichert und durch Rechromatographie kristallin erhalten werden.

Die drei Steroide [$F = 252^{\circ} \text{ C}$ (Laborbezeichnung: SM-1), $F = 134^{\circ} - 137^{\circ} \text{ C}$ (Laborbezeichnung: SM-2) und $F = 292^{\circ} - 295^{\circ} \text{ C}$ (Laborbezeichnung: SM-3)] wurden in der üblichen Weise physikalisch-chemisch und spektroskopisch charakterisiert.

Für die Substanz mit dem Schmelzpunkt $F = 252^{\circ} \text{ C}$ (Laborbezeichnung: SM-1) wurde die Konstitution (22R)-22-Hydroxy-6-oxo-4α-Methyl-5α-Stigmast-7-en-3β-yl-Benzoat ermittelt. Dieser Naturstoff wurde bisher ein einziges Mal von J.A. BEISLER und Y. SATO und zwar aus *Solanum xanthocarpum*

isoliert und als Carpesterol bezeichnet. Eine authentische Probe von Carpesterol erwies sich mit der Substanz SM-1 als identisch (Mischschmelzpunkt, Cochromatographie, IR-Überlagerungsspektrum).

Steroid SM-2 wurde als β -Sitosterol identifiziert, eine im Pflanzenreich außerordentlich weit verbreitete Substanz.

Substanz SM-3 erwies sich als β -Sitosterol- β -D-Glukose, ebenfalls ein Naturstoff, der schon mehrfach in der Literatur beschrieben wurde.

(4) Während der sauren Hydrolyse der Glykoside SM-4 bis SM-6 entsteht neben dem Aglykon Solasodin das Artefakt $\Delta^{3,5}$ -Solasodien. Im Rahmen dieser Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Kristallographie (Herrn Zabel) der FUB eine röntgenographische Bestimmung der Konformationen dieser zwei Steroide durchgeführt und dabei die Bindungslängen, Bindungswinkel und Torsionswinkel gemessen. Überraschend zeigt sich, daß die Einführung einer Doppelbindung in Ring A Konformationsunterschiede in den Ringen D und E zur Folge hat.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) K. SCHREIBER in: The Alkaloids X, ed. by R.H.F. Manske, Academic Press, New York, (1968).
- 2) K. SCHREIBER in: IUPAC Chemistry of Nat. Prod. VI, Butterworth, London.
- 3) H. SANDER, M. ALKEMEYER, R. HÄNSEL, Arch. Pharm. 295,6, (1962).
- 4) H. SANDER, Planta Medica 52,447, (1958).
- 5) Curtis's Botanical Magazine, Vol. XLIV, (1928).
- 6) Pareys Blumen-Gärtnerei, II, 488, (1960).
- 7) R. TSCHESCHE, G. WULF, Chem. Ber. 94,2019, (1961).
- 8) SANCHEZ, La Flora de Valle de Mexico, 350, (1968).
- 9) L. BRIGGS, E.G. BROOKER, W.E. HARVEY, A.L. ODELL, J. Chem. Soc. 3,3587, (1953).
- 10) L.H. BRIGGS, J. Chem. Soc. 2,1422, (1958).
- 11) L.H. BRIGGS, R.C. CAMBIE, J.L. HOARE, J. Chem. Soc. 2848, (1963).
- 12) D. GRÜGER, Planta Medica 28,269, (1975).
- 13) K. SCHREIBER in: The Alkaloids X,23, ed. by R.H.F. Manske, Academic Press, New York, (1968).
- 14) L.H. BRIGGS, J. Chem. Soc. 3013, (1950).
- 15) L.H. BRIGGS, E.G. BROOKER, J. Chem. Soc. 1419, (1958).
- 16) R. KUHN, Chem. Ber. 88,1492, (1955).
- 17) J.F. VERBIST, R. MONNET, Pl. Med. Phyt. 8,4,269, (1974).
- 18) L. ANDREEVA, Khim.-Farm. Zh. 8(11),52, (1974), ref. in C.A. 82,129205, (1975).
- 19) R. BOGNAR, S. MAKLEIT, Pharmazie 20,40, (1965).
- 20) V. PRELOG, D. JEGER in: The Alkaloids VII,343, ed. by R.H.F. Manske, Academic Press, New York, (1960).
- 21) D.A.H. TAYLOR, J.Chem. Soc. 4,4215, (1958).
- 22) A. LABENSKII, N. KORETSKAYA, Med. Brom. S.S.S.R., 15,3,41, (1961), ref. in C.A. 55,21483, (1961).
- 23) P.BITE, J.JOKAY, L.PONGRACZ-STERK, Acta Chim. Acad. Sci. Hung. 34,363, (1962).
- 24) I. SETH, I. CHATTERJEE, J. Inst. Chem. Calcutta 41,194, (1968), ref. in C.A. 72,79405, (1970).
- 25) R. PURI, J.K. BHATHAGAR, Phytochemistry 14,2096, (1975).
- 26) A. NOVUZOV, M. ASLANOV, M. ISMAILOV, Khim. Priir. Soedin 11,434, (1975), ref. in C.A. 84,40726, (1976).
- 27) S. SINGH, N.M. KHANNA, Phytochemistry 13,2020, (1974).

- 28) C. SEELKOPF, Arch. Pharm. 301,111,(1968).
- 29) A.D. TUROVA, M. BELYKH, Farmakol. i Toksikol 24,469, (1961), ref. in C.A. 56,1966,(1962).
- 30) A.D. TUROVA, M. BELYKH, from Otkrytiya, Izobret., Prom. Obraztsy, Tovarnye Znaki 49(14),9,(1972), ref. in C.A. 77,52318,(1972).
- 31) S. LAHIRI, I. CHATTERJEE, Experientia 22,464,(1966).
- 32) J. KULCSAR-GERGELY, Arzneim.-Forsch. 26,55,(1976).
- 33) L. SHASHKINA, S. RYNDINA, Farmakol. Toksikol, 37,719, (1974), ref. in C.A. 82,68352,(1975).
- 34) R. KEELER, ST. YOUNG, D. BROWN, Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 13(4),723,(1976).
- 35) K. SCHREIBER, Tagungsberichte Nr. 27,47, Deutsche Akademie der Landwirtschaftswissenschaften Berlin (1961).
- 36) Y. SATO, H.K. MILLER, E. MOSETTING, J. Amer. Chem. Soc. 73,5009,(1951).
- 37) Y. SATO, A. KATZ, E. MOSETTING, J. Amer. Chem. Soc. 73,880,(1951).
- 38) R.E. MARKER, R.B. WAGNER, P. ULSHOFER, E. WITTBECKER, D. BOLDSMITH, J. Amer. Chem. Soc. 69,2167,(1947).
- 39) K. SCHREIBER in: The Alkaloids X,107, ed by R.H.F. Manske, Academic Press, New York,(1960).
- 40) G. SELMECI, G. VALOVICS, Pharmazie 22,173,(1967).
- 41) JACQUIN, CONES Plantarum rariorum (1781),I,85,45.
- 42) D. DANNEELS, M. ANTEUNIS, Organic Magnetic Resonance 6,617,(1974).
- 43) M. SPITELLER-FRIEDMANN, G. SPITELLER, Massenspektren von Steroiden, Fortschr. chem. Forsch. 12,440,(1969).
- 44) B.A. KNIGHTS, J. Gaschromatography 5,273,(1967).
- 45) E. STAHL, Dünnschichtchromatographie, Springer-Verlag, Berlin,(1967).
- 46) R.F. ZÜRCHER, Helv. Chim. Acta 44,1380,(1961).
- 47) R.F. ZÜRCHER, Helv. Chim. Acta 46,2053,(1963).
- 48) H. SCHERRER, Helv. Chim. Acta 52,2428,(1969).
- 49) W.W. SIMONS, M. ZANGER, The Sadtler Guide to NMR-Spectra, Sadtler Research Laboratories (1972).
- 50) A.I. SCOTT, Interpretation of the Ultraviolet Spectra of Natural Products, Pergamon Press,(1964).
- 51) G. HEINRICH, H. HOFFMEISTER, Experientia 23,995,(1967).
- 52) J.N. KAPLANIS, Science 157,1436,(1967).
- 53) G. von UNRUH, M. SPITELLER-FRIEDMANN, G. SPITELLER, Tetrahedron 26,3289-3301,3303-3311,3329-3346,(1970).
- 54) M. SPITELLER-FRIEDMANN, G. SPITELLER, J. org. Mass. Spektrometry 1,231,(1968).

- 55) L. SAWLEWICZ, E. WEISS, T. REICHSTEIN, *Helv. Chim. Acta* 50,530,(1967).
- 56) A. FURLENMEIER, A. FÜRST, G. WALDVOGEL, P. HOCKS, R. WIECHERT, *Helv. Chim. Acta* 50,2387,(1967).
- 57) J.A. BEISLER, Y. SATO, *J. Amer. Chem. Soc.* 92,7005,(1970).
- 58) J.A. BEISLER, Y. SATO, *J. Org. Chem.* 36,25,3946,(1971).
- 59) J.A. BEISLER, Y. SATO, *Phytochemistry* 12,397,(1973).
- 60) *Varian High Solution NMR-Spektra Catalog*, (1962).
- 61) W. NEUDERT, H. RÜPKE, *Steroid-Spektrenatlas*, Springer-Verlag, Berlin, (1965).
- 62) JOEL, *High Resolution NMR-Spektra*, Sadtler, Philadelphia, (1967), No 60-218.
- 63) R.F.N. HUTCHINS, J.N. KAPLANIS, *Steroids* 13,605,(1969).
- 64) T.K. DEVON, A.S. SCOTT, *Handbook of Naturally Occuring Compounds*, II, Academic Press, New York, (1972).
- 65) L. FIESER, M. FIESER, *Steroide*, Verlag Chemie, Weinheim, (1961).
- 66) A. DENOEL, C. COUNE, *Pl. Med. Phyt.* 9,4,14,(1975).
- 67) L. MITSCHER, M. BATHALA, C.W. CLARK, *Lloydia* 38, 117, (1975).
- 68) M. ROBERTA, P. SCHAFFER, *Arch. Biochem. Biophys.* 47,419,(1953).
- 69) M. HAMMOUDA, M. RIZK, *Planta Medica* 22,188,(1972).
- 70) G.A. HOYER, W. SUCROW, D. WINKLER, *Phytochemistry* 14,539,(1975).
- 71) M. FAYEZ, A. SALEH, *Phytochemistry* 6,433,(1967):
- 72) L.A. PEREZ-MEDINA, E. TRAVECEDO, *Planta Medica* 12,478,(1964).
- 73) A. URZUA, B.K. CASSELS, *Phytochemistry* 11,3548,(1972).
- 74) H. BUDZIKIEWICZ, *Monatsh.* 93,1033,(1962).
- 75) W. FAUL, C. DJERASSI, *Org. Mass. Spect.* 1187,(1970).
- 76) M. BOLL, *Acta Chem. Scand.* 19,1365,(1965).
- 77) K. RAJARAMAN, A.K. BATTA, S. RANGASWAMI, *J. Chem. Soc.* 1560,(1975).
- 78) HOUDEN, STROUF, *Spectral data and physical constants of alkaloids*, Heyden Ltd., London, (1972).
- 79) L.H. BRIGGS, Y. SATO, *J. Chem. Soc.* 3.3417,(1960).
- 80) K. SCHREIBER, *Pharmazie* 10,379,(1955).
- 81) L. DORFMAN, *Chem. Rev.* 53,47,(1953).
- 82) S.J. STOKES, C.L. WEGNER, H. ROSENBERG, *Planta Medica* 28,101,(1975).

- 83) K. HEYNS, D. MÜLLER, Tetrahedron Letters 48,6061 (1966).
- 84) H. BUDZIKIEWICZ, C. DJERASSE, D. WILLIAMS, Structure elucidation of natural products by mass spectrometry, Vol II,106, Holden-Day, San Francisco.
- 85) H. BEYER, Lehrbuch der Organischen Chemie, Hirzel Verlag, Leipzig, (1973).
- 86) R. BUCOURT in Topics in Stereochemistry, Vol 8,159, (1974), ed. by N.L. ALLINGER, E.L. ELIEL.
- 87) R. TSCHESCHE, G. WULFF in Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe, Vol 30,461, ed. by L. ZECHMEISTER.
- 88) R. KUHN, Chem. Ber. 88,289, (1955).
- 89) R. KLAUS, J. Chromatogr. 16,311, (1964).
- 90) N. SEILER, G. WERNER, M. WIECHMANN, Naturwissenschaften 50,643, (1963).
- 91) J. TOUCHSTONE, Quantitative Thin Layer Chromatography, J. Wiley and Sons, New York, (1973).
- 92) Ch. J. POUCHERT, J. CAMPBELL, The Aldrich Library of NMR-Spectra, Vol X, Aldrich Chemical Company INC, (1974).

7. LEBENSLAUF

Am 12.5.1949 wurde ich, Günter Deckardt, als zweiter Sohn des Dipl.-Ing. Wilhelm Deckardt und seiner Frau Charlotte geb. Schümann in Frankfurt am Main geboren.

Ostern 1955 wurde ich in die Volksschule-Süd in Oberursel eingeschult. 1959 bestand ich die Aufnahmeprüfung zu dem Gymnasium Oberursel. Herbst 1964 wechselte ich auf die Höhere Privatilehranstalt Dr. Richter in Kelkheim über, wo ich im Juni 1968 die Reifeprüfung absolvierte.

Vom August 1968 bis Juli 1970 war ich in der Rathaus-Apotheke in Oberursel als Apothekerpraktikant tätig. Die Ausbildung schloß ich im Juni 1970 mit der Vorexamensprüfung ab.

Vom WS 70/71 an studierte ich Pharmazie an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität zu Frankfurt am Main und legte im Oktober 1973 das pharmazeutische Staatsexamen ab.

Seit Anfang 1974 beschäftige ich mich mit der vorliegenden Arbeit unter der Leitung von Prof. Dr. Hänsel an der Freien Universität zu Berlin im Fachbereich Pharmazie. Am 1.10.76 wurde ich zum Wissenschaftlichen Assistenten unter Berufung in das Beamtenverhältnis auf Widerruf am gleichen Institut ernannt.

difo
druck

laubanger 15
8600 bamberg
tel.: 09 51/6 43 21